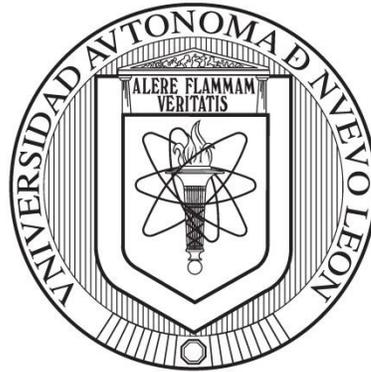


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA DE EFLUJO DE
CATIONES Dmct (Yali0F19734p) EN *Yarrowia lipolytica*.

Por

L.B.G. KATIA JAMILETH GONZÁLEZ LOZANO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

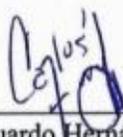
Julio, 2020

**Caracterización de la función de la proteína de eflujo de cationes Dmct
(Yali0F19734p) en *Yarrowia lipolytica*.**

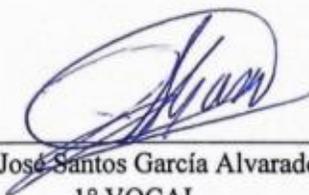
Comité de Tesis



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
PRESIDENTE



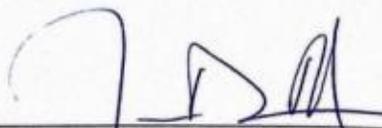
Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
SECRETARIO



Dr. José Santos García Alvarado
1° VOCAL



Dr. Hamlet Avilés Arnaut
2° VOCAL



MC. Juan Manuel Adame Rodríguez
3° VOCAL

**Caracterización de la función de la proteína de eflujo de cationes Dmct
(Yali0F19734p) en *Yarrowia lipolytica*.**

Dirección de Tesis



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

DIRECTORA



Dr. Eduardo Campos Góngora
DIRECTOR EXTERNO

AGRADECIMIENTOS

A la vida.

“Casi siempre damos por sentado aquello por lo que más agradecidos deberíamos estar”

-Cynthia Ozick

DEDICATORIA

A mi familia por el apoyo incondicional,
a mis maestros por todas las enseñanzas otorgadas,
al amor de mi vida por tanta paciencia.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	ix
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Metales en la célula.....	2
2.2 Metabolismo del hierro	4
2.3 Metabolismo del cobre.....	9
2.4 Metabolismo del zinc.....	12
2.5 Regulación de la homeostasis de los metales.....	15
2.6 Transportadores CDF.....	16
2.7 Especificidad vs diversidad del transporte	19
2.8 Transporte de metales en <i>Yarrowia lipolytica</i>	21
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. HIPÓTESIS	27
V. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos particulares	28
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
ETAPA 1	29
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	29
6.1 Predicción de la localización subcelular	29
6.2 Predicción de la topología transmembranal	29
6.3 Análisis filogenético y predicción de proteínas ortólogas	29
6.4 Análisis de similitud a nivel de aminoácidos	29
6.5 Análisis de la región reguladora del gen <i>dmct</i>	30
6.6 Análisis de posibles genes con actividad compensatoria a <i>dmct</i>	30

ETAPA 2	31
GENERACIÓN DE LA CEPA COMPLEMENTARIA Y ANÁLISIS GENOTÍPICO DE LAS CEPAS	31
6.7 Material biológico.....	31
6.8 Preparación de medios de cultivo y soluciones.....	31
6.9 Caracterización genotípica de las cepas P01A y Δ Dmct.	41
6.10 Generación de la cepa complementaria.....	44
6.11 Purificación y cuantificación de material genómico	44
6.12 Generación de células litio-competentes <i>Y. lipolytica</i>	45
6.13 Transformación por la técnica de choque térmico de <i>Y. lipolytica</i>	46
6.14 Selección de células complementarias	46
6.15 Caracterización molecular de las cepas	46
ETAPA 3	49
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS	49
6.16 Análisis cualitativo del crecimiento celular de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct en presencia de cationes	49
6.17 Análisis cuantitativo del crecimiento celular de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct en presencia o ausencia de cationes.....	49
6.18 Comparación de la acumulación intracelular de cationes metálicos divalentes de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct mediante microscopia de fluorescencia.....	51
6.19 Análisis estadístico	52
VII. RESULTADOS	53
ETAPA 1	53
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	53
7.1 Análisis de similitud	53
7.2 Comparación con proteínas similares	55
7.3 Búsqueda y análisis de dominios funcionales.....	57
7.4 Estructura tridimensional.....	58
7.5 Análisis filogenético y predicción de proteínas ortólogas	59
7.6 Análisis de región reguladora	60
ETAPA 2	61
ANÁLISIS GENOTÍPICO DE LAS CEPAS	61
7.7 Generación de la cepa complementaria “RDmct”	61
7.8 Caracterización genotípica de las cepas P01A, Δ Dmct Y RDmct	64
ETAPA 3	67
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	67
7.9 Análisis del crecimiento y morfología de las cepas de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de <i>Y. lipolytica</i>	67

7.9.1 Análisis cualitativo	67
7.9.2 Análisis cuantitativo	72
7.9.3 Análisis de la acumulación intracelular de cationes metálicos divalentes	81
7.10 Análisis de genes de respuesta compensatoria a <i>dmct</i>	85
VIII. DISCUSIÓN	87
IX. CONCLUSIONES	93
X. PERSPECTIVAS	94
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS	103
RESUMEN BIOGRÁFICO	106

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla	Nombre	Página
1	Grupos de los transportadores CDF	20
2	Genes homólogos de levadura encontrados en humanos con actividad relacionada en la homeostasis de metales de transición	22
3	Homólogos del gen <i>dmct</i> de <i>Y. lipolytica</i>	24
4	Formulaciones de medio YNB sólido con diferentes concentraciones calcio, cobre, zinc y hierro.	33
5	Formulaciones de medio YNB líquido con diferentes concentraciones calcio, cobre y zinc.	34
6	Formulaciones de medio MMM líquido con 2-8 mM de hierro	35
7	Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen <i>dmct</i> y sus variables	42
8	Temperatura óptima, tiempo de extensión y tamaño esperado del fragmento amplificado de las combinaciones de oligonucleótidos utilizados	43
9	Componentes de reacción de PCR con la enzima Top Taq® DNA polymerase	43
10	Componentes de reacción de PCR con la enzima Platinum™ Taq DNA polymerase	44
11	Condiciones utilizadas para la restricción enzimática	48
12	Posible localización subcelular de la proteína Dmct	55
13	Comparación de la secuencia de los posibles homólogos ortólogos a la proteína codificada por <i>dmct</i>	56
14	Predicción de los dominios transmembranales de la proteína Dmct	57
15	Genes con posible actividad compensatoria en respuesta a la ausencia del gen <i>dmct</i> .	86
16	Tabla completa de la posible localización subcelular de la proteína Dmct	103

17	Lista de posibles factores de transcripción con sitios de unión en la región promotora de <i>dmct</i>	104
18	Lista de softwares utilizados	105
Figura	Nombre	Página
1	Tabla periódica bloque D. Metales de transición y sus características físicas	3
2	Estados de oxidación de los metales de transición	4
3	Homeostasis del hierro en <i>S. cerevisiae</i>	6
4	Homeostasis del cobre en <i>S. cerevisiae</i>	10
5	Homeostasis del zinc en <i>S. cerevisiae</i>	13
6	Sistema de transporte transmembranal antiportador	16
7	Predicción de la topología transmembranal de las proteínas CDF	17
8	Modelado predictivo de la estructura 3D de la proteína Dmct de <i>Y. lipolytica</i>	25
9	Tamaño del bandejo esperado con la digestión enzimática de las variantes del gen <i>dmct</i> con las enzimas EcoRI, XhoI y SacI	48
10	Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de la región correspondiente al dominio CDF de las proteínas homologas al gen <i>dmct</i> presentes en diferentes especies	53
11	Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las proteínas homologas al gen <i>dmct</i> presentes en diferentes especies	54
12	Disposición de los dominios transmemembranales de la proteína Dmct	57
13	Propuesta topológica de la proteína Dmct	58
14	Comparación de la proteína codificada por el gen <i>dmct</i> contra la proteína Cot1 de <i>S. cerevisiae</i>	59
15	Filoma del gen <i>dmct</i> de <i>Y. lipolytica</i>	59
16	Posibles sitios de unión de reguladores transcripcionales del gen <i>dmct</i>	60
17	Producto de PCR correspondiente al gen <i>dmct</i> de la cepa P01A	61
18	Crecimiento confirmatorio de las tres cepas de <i>Y. lipolytica</i> en medio YNB	63

19	Crecimiento celular microscópico esperado de la cepa RDmct YNB	63
20	Diagrama de las regiones reconocidas por los oligonucleótidos para la amplificación del gen <i>dmct</i> con su región promotora, terminadora e interna	64
21	Análisis molecular de la cepa complementaria a partir de la amplificación del gen <i>dmct</i> y su región interna	65
22	Análisis molecular de la cepa complementaria digerida con las enzimas EcoRI, XhoI y SacI	66
23	Crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB adicionado con calcio, cobre, hierro y zinc	68
24	Morfología de las colonias de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB adicionado con calcio	69
25	Morfología de las colonias de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB adicionado con cobre	70
26	Morfología de las colonias de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB adicionado con hierro	71
27	Morfología de las colonias de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB adicionado con zinc	71
28	Comparación del crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de <i>Y. lipolytica</i> en medio adicionado con calcio	72
29	Comparación del crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de <i>Y. lipolytica</i> en medio adicionado con cobre	73
30	Comparación del crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de <i>Y. lipolytica</i> en medio adicionado con hierro	74
31	Comparación del crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de <i>Y. lipolytica</i> en medio adicionado con zinc	75
32	Morfología celular de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB líquido añadido con calcio	76
33	Morfología celular de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB líquido añadido con cobre	77

34	Morfología celular de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB líquido añadido con hierro	78
35	Morfología celular de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YNB líquido añadido con zinc	79
36	Crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct en medio YNB líquido sin metales	80
37	Crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct con privación de nutrientes en medio YNB líquido sin metales	81
38	Comparación de la posición de núcleos, morfología y distribución de la acumulación de metales intracelulares de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i>	82
39	Efecto de la adición de cobre en la distribución intracelular del metal y la morfología celular de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i>	83
40	Efecto de la adición de hierro en la distribución intracelular del metal y la morfología celular de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i>	84
41	Efecto de la adición de zinc en la distribución intracelular del metal y la morfología celular de las cepas P01A y Δ Dmct de <i>Y. lipolytica</i>	85

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
CDF	Cation diffusion facilitator
CBP	Cuanto basta para
Dmct	Divalent metal cation transporter
Dmctp	Divalent metal cation transporter protein
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
h	Horas
M	Molar
mM	Milimolar
MMM	Medio mínimo mineral
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pm	Picómetros
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Lauril sulfato de sodio
TA	Temperatura ambiente
Tm	Temperatura de fusión
U	Unidades
V	Voltios
YNB	Yeast Nitrogen Base
°C	Grados centígrados

RESUMEN

Yarrowia lipolytica es una levadura ascomiceto con características únicas que la posicionan como un organismo de gran interés en la industria de la biotecnología; entre las características fisiológicas resalta su tolerancia a altas concentraciones de metales pesados por diversos mecanismos que aún no han sido descritos. La membrana celular juega un papel esencial en la resistencia y tolerancia de cualquier organismo porque es el contacto directo de la célula con el exterior. La tolerancia a los metales pesados y otros iones se ve facilitada por las proteínas transmembrana cuya variación en la estructura determina su función y especificidad de transporte. Análisis bioinformáticos revelaron que la proteína sistemáticamente llamada Yali0F19734p de *Y. lipolytica* tiene un dominio funcional característico de la familia de proteínas de eflujo de cationes, cuyos miembros se han relacionado con la tolerancia a los cationes metálicos divalentes como el cadmio, el zinc y el cobalto. Sin embargo, los mecanismos y genes involucrados en el intercambio de cationes aún no se han descrito en esta levadura. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la función de la proteína Yali0F19734p, nombrada Dmct, mediante la comparación del comportamiento de una cepa mutante contra la cepa parental P01A y la cepa complementaria generada a partir de la restauración del gen *dmct* en la cepa mutante. El fenotipo de cada cepa se confirmó por medio de cultivo diferencial basado en la auxotrofia de las cepas, y el genotipo se confirmó por PCR y restricción enzimática. La fenotipificación se llevó a cabo comparando el crecimiento de las cepas en medios de cultivo adicionados con diferentes concentraciones de cationes divalentes (Zn, Cu, Fe y Ca), con el objetivo de evaluar la respuesta celular y la tolerancia de las células a la presencia y/o ausencia de tales cationes. Los resultados indican que la ausencia del gen *dmct* produce cambios en la morfología celular tanto a nivel macroscópico y microscópico. Cuando las células se sometieron a estrés iónico por presencia de metales, se observaron cambios morfológicos con los cationes de zinc, cobre y hierro, pero no con el calcio, al observar mediante fluorescencia la internalización de los cationes no se observaron diferencias entre la cepa que contenía el gen y la que no, debido a que ambas logran internalizar los iones hacia citoplasma y vacuolas. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que la proteína Dmct participa en las vías de transporte no canónicas de cationes metálicos divalentes como Fe, Zn y Cu, sin embargo, su ausencia no resulta comprometer el desarrollo celular ni la homeostasis de estos iones.

ABSTRACT

Yarrowia lipolytica is an ascomycete yeast with unique characteristics that position it as an organism of great interest in the biotechnology industry; Among the physiological characteristics, its tolerance to high concentrations of heavy metals stands out due to various mechanisms that have not yet been described. The cell membrane plays an essential role in the resistance and tolerance of any organism because it is the direct contact of the cell with the outside. Tolerance to heavy metals and other ions is facilitated by transmembrane proteins whose variation in structure determines their function and transport specificity. Bioinformatic analyzes revealed that the protein systematically called Yali0F19734p from *Y. lipolytica* has a characteristic functional domain of the cation efflux protein family, whose members have been related to tolerance to divalent metal cations such as cadmium, zinc and cobalt. However, the mechanisms and genes involved in cation exchange have not yet been described in this yeast. The objective of this work was to characterize the function of the protein Yali0F19734p, named Dmct, by comparing the behavior of a mutant strain against the parental strain P01A and the complementary strain generated from the restoration of the dmct gene in the mutant strain. The phenotype of each strain was confirmed by differential culture medium based on the auxotrophy of the strains, and the genotype was confirmed by PCR and enzyme restriction. Phenotyping was carried out by comparing the growth of the strains in added culture media with different concentrations of divalent cations (Zn, Cu, Fe and Ca), with the aim of evaluating the cellular response and the tolerance of cells to presence and/or absence of such cations. The results indicate that the absence of the dmct gene produces changes in cell morphology at both the macroscopic and microscopic levels. When the cells were subjected to ionic stress due to the presence of metals, morphological changes were observed with the zinc, copper and iron cations, but not with calcium. Observing the internalization of the cations by fluorescence, no differences were observed between the strain that contained the gene and the one that did not, because both manage to internalize the ions into the cytoplasm and vacuoles. In conclusion, the results obtained suggest that the Dmct protein participates in the non-canonical transport pathways of divalent metal cations such as Fe, Zn and Cu, however, its absence does not turn out to compromise cell development or homeostasis of these ions.

I. INTRODUCCIÓN

El zinc, hierro y cobre son iones esenciales para los seres vivos. Una de cada cuatro proteínas requiere de ellos para cumplir sus requerimientos tanto estructurales como funcionales, esto ha llevado a que los organismos desarrollen complejos sistemas de toma, transporte, carga y almacenamiento a fin de evitar que sus propiedades fisicoquímicas causen efectos citotóxicos asociados a su desregulación (Bleackley y MacGillivray 2011). Las levaduras cuentan con genes y sistemas biológicos encargados de mantener la homeostasis de metales distintos a lo reportado en organismos procariotas, al ser de un orden superior el grado de conservación del genoma de levaduras y humanos es alto, por lo que los hallazgos y el conocimiento adquirido resulta extrapolable a diversos padecimientos relacionados al transporte de metales, demostrando así su utilidad para la investigación en esta área (Casaregola *et al.* 2000).

Yarrowia lipolytica es una levadura con características fenotípicas y genotípicas muy particulares entre las que destaca su capacidad de crecer con diversas fuentes de carbono, amplios rangos de pH y concentraciones elevadas de metales (Nicaud 2012). Su tolerancia a metales pesados y otros iones se facilita gracias a proteínas transportadoras transmembranales, estas se integran a la membrana y se encargan del movimiento de átomos o moléculas pequeñas cargadas ya sea dentro o fuera de la célula por medio de un agente transportador o un poro a través de una bicapa lipídica, de un lado de una membrana a otro (Karp 2009). El objetivo de este trabajo fue caracterizar la función de la proteína Dmct (Yali0F19734p) codificada por el gen *dmct* (*Yali_F19734g*) en *Y. lipolytica* partiendo de una cepa mutante construida a partir de la inserción gen marcador *Ura3*. Dicha proteína tiene en su secuencia un dominio perteneciente a la familia de proteínas de eflujo de cationes (CDF), los miembros de este grupo son proteínas integrales de membrana que se ha reportado aumentan la tolerancia a iones metálicos divalentes debido a que los movilizan desde citoplasma al exterior de la célula y/o compartimientos intracelulares, manteniendo así la homeostasis y reduciendo la toxicidad provocada por estos (Burgs 1997; Jayaswal 1998). Con base en esto se buscó hacer el análisis experimental para caracterizar el tipo de transporte y su especificidad ante distintos cationes metálicos divalentes.

II. ANTECEDENTES

2.1 Metales en la célula

Los metales de transición son nutrientes esenciales para el crecimiento, desarrollo, función y mantenimiento apropiado de cualquier organismo. Los principales involucrados son el hierro, zinc y cobre, cationes metálicos con propiedades fisicoquímicas aptas para la incorporación en diversos sistemas biológicos. Estos metales pueden coexistir en múltiples estados de valencia, por tanto, tienen la propiedad de participar en la cadena de transferencia de electrones, proceso fundamental en la respiración celular y la fotosíntesis en mitocondria y cloroplasto respectivamente (Ruthenford y Bird 2004; Montanini *et al.* 2007; Bleackley y MacGillivray 2011). El hierro, zinc y cobre cumplen también con el rol estructural siendo cofactores de alrededor del 25% de las enzimas, componentes de grupos prostéticos y como parte de complejos proteicos y factores de transcripción. (Ruthenford y Bird 2004; Waldron y Robinson 2009; Bleackley y MacGillivray 2011). El zinc particularmente conforma el centro catalítico de numerosas enzimas y su ausencia compromete su función (Fitsanakis, Zhang, Garcia y Aschner 2010).

En el ambiente, suceden eventos en donde la alta concentración de estos iones, junto con algunos otros metales similares no esenciales como el plomo, la plata, mercurio o cadmio pueden provocar que los metales esenciales se vuelvan en extremo tóxicos debido a las reacciones de competencia que conlleva un aumento de daños por oxidación y generación de especies reactivas de oxígeno (Waldron y Robinson 2009). Es por ello por lo que se han generado mecanismos de regulación que distribuyen estos iones de manera que sea más tolerante para las células, creando así una red de eventos que permiten la absorción, extrusión, quelación, tráfico y almacenamiento de los iones, permitiendo el mantenimiento homeostático de los metales a nivel celular (Montanini *et al.* 2007; Bleackley y MacGillivray 2011).

Se han identificado diversos mecanismos por los cuales se mantiene la homeostasis de metales en la célula a nivel no tóxico. Estos mecanismos son desencadenados por acción de factores de transcripción los cuales detectan cambios en la concentración de iones traza y permiten coordinar la expresión de genes que consecuentemente participan en la

La mayoría de los trastornos relacionados al desequilibrio de metales en la célula están relacionados a enfermedades genéticas en las vías de regulación del equilibrio homeostático iónico lo que provoca tanto una sobrecarga como una deficiencia de iones en la célula manifestando un amplio repertorio de síntomas asociados a múltiples enfermedades.

2.2 Metabolismo del hierro

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre. Tiene el número atómico 26 y se sitúa en la primera fila de los metales de transición en la tabla periódica (Figura 1), sus estados de oxidación varían de Fe (-II) como un anión a Fe (VI) en la forma del ion ferrato, siendo los estados Fe (II) y Fe (III) los más comunes y de relevancia biológica (figura 2) (Harris 2002; Bleackley y MacGillivray 2011). A pH fisiológico (7.0-7.4 comúnmente) el hierro es en extremo insoluble, por lo que los organismos desarrollaron diversos mecanismos para la adquisición de este nutriente esencial que se encuentra biológicamente no disponible (Ruthenford y Bird 2004). Las reacciones de oxidación-reducción que permiten la transferencia de electrones entre la forma Fe (II) y Fe (III) se logra mediante agentes reductores abundantes de manera intracelular como lo son el ascorbato y el oxígeno molecular, las formas de Fe (IV) y Fe (V) también se pueden presentar en procesos biológicos, pero solo en papeles intermedios formando puentes en los mecanismos catalíticos de algunas enzimas que utilizan el ion hierro (Pierre y Fontcave 1999).

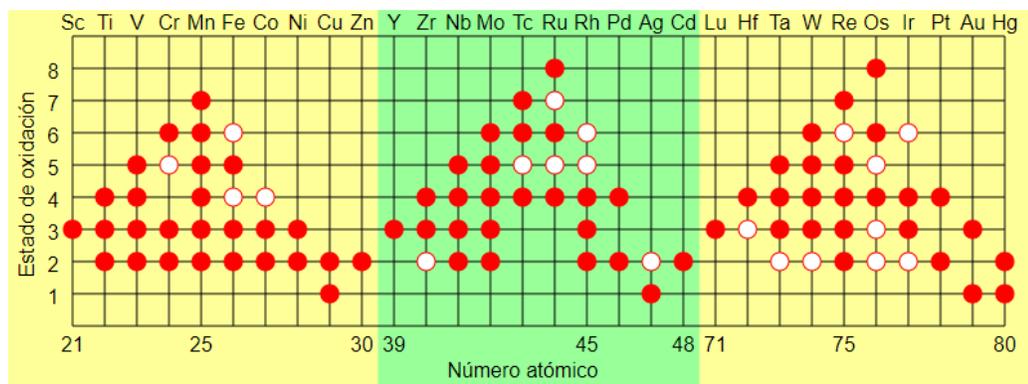


Figura 2. Estados de oxidación de los metales de transición. En rojo y blanco se muestran los estados oxidativos más comunes y menos comunes respectivamente (Wan 2019).

La biodisponibilidad de hierro es por naturaleza baja debido a que en el ambiente el Fe^{2+} que es soluble al estar en contacto con el oxígeno tiende a la autooxidación espontánea a Fe^{3+} que es insoluble en agua pH neutro (Kosman 2003). Evolutivamente los organismos que viven en ambientes oxigenados han tenido que desarrollar mecanismos para eliminar y solubilizar el hierro y adquirirlo de una forma y otra, así como combatir la toxicidad de la producción de ERO (Bleackley y MacGillivray 2011).

Los sistemas metabólicos de hierro en hongos se regulan a nivel transcripcional de acuerdo con la disponibilidad de este ion. *Saccharomyces cerevisiae* es el organismo modelo por excelencia para el transporte de metales debido a su metabolismo aerobio/anaerobio que la llevo a establecer evolutivamente diversos mecanismos obtener homeostasis iónica. En condiciones de anaerobiosis el hierro se encuentra en forma ferrosa por lo que está disponible para incorporarse en diversos procesos mientras que cuando ocurre la respiración celular por un ambiente aerobio las células lidian con la oxidación del hierro que pasa a estar en forma insoluble.

El genoma de *S. cerevisiae* incluye un set de genes cuya expresión se induce en respuesta a niveles bajos de hierro y su función es la adquisición de este ion a través de la superficie celular (Figura 3, A). Los iones de hierro son introducidos al espacio intracelular a través de sistemas de alta y baja afinidad (*fet3*, *ptr1* y *ptr2*) (Dix, Bridgham, Broderius, Byersdorfer y Eide 1994; Stearman, Yuan, Yamaguchi-Iwai, Klausner, y Dancis 1996). El sistema de alta afinidad incluye el gen *fet3* el cual codifica a una proteína ferroxidasa que necesita de la unión de cobre para su funcionamiento, por ende, el sistema de transporte (*atx1* y *Ccc2*) de cobre se ve relacionado en este punto con el del hierro, cuando existe una deficiencia en el cobre también se ve comprometido el transporte de hierro mediante ésta vía (Yuan *et al.* 1995; Yamaguchi-Iwai, Stearman, Dancis, y Klausner 1996; Lin, Pufahl, Dancis y Klausner 1996). En la superficie celular se encuentran también dos flavocitocromos (*fre1* y *fre2*) los cuales tienen la función de reducir el hierro férrico para proporcionar hierro ferroso a la célula y que este sea introducido al transporte de alta afinidad (Voutsina, Fragiadakis, Boutla, y Alexandraki 2001; Waters y Eide 2002).

Los sideróforos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que tienen la capacidad de quelar el hierro, aunque *S. cerevisiae* no tiene la capacidad de producción de estas

proteínas que forman parte del sistema de transporte vacuolar (*fet5*, *fth1* y *smf3*), transportadores mitocondriales (*mrs4*) y proteínas involucradas en la biosíntesis de grupos de azufre y hierro (Lsu1-2) (Voisard, Wang, McEvoy, Xu, y Leong 1993; Thorvaldsen, 1994; Schilke, Voisine, Beinert, y Craig 1999; Urbanowski y Piper 1999; Portnoy, Liu y Culotta 2000; Portnoy, Jensen y Culotta 2002).

Los sistemas de adquisición de hierro, en hongos, están regulados a nivel transcripcional por la disponibilidad de hierro. En *S. cerevisiae* se ha descrito que cuando ocurre una privación de hierro el transporte está mediado por los factores de transcripción Aft1 y Aft2, ambos factores regulan la expresión de genes de respuesta a través del elemento 5'-CACCC-3' el cual reconoce el ion hierro (Yamaguchi-Iwai, Stearman, Dancis, y Klausner 1996; Ruthenford, Jaron y Winge 2003). Aft1 tiene la capacidad de autorregularse uniéndose a su propio promotor en presencia de hierro (Lee *et al.* 2002). La pérdida de esta unión inicia su respuesta transcripcional, ésta vía se ha observado en diversos mecanismos transcripcionales en procariotas sensibles al hierro (Andrews, Robinson y Rodríguez-Quñonez 2003).

Independiente a este mecanismo de regulación, en cambios diuixicos Aft1 se regula con base en los niveles de glucosa cuando ocurre un cambio en la adaptación de las células de *S. cerevisiae* y cambia del metabolismo fermentativo al respiratorio (Zhang *et al.* 2003).

El mecanismo por el cual detecta Aft1 y Aft2 detecta el hierro aún no ha sido descrito completamente, sin embargo, se sabe que el desplazamiento núcleo-citoplasma provocado por una fosforilación de origen desconocido es fundamental para la detección de este (Ruthenford y Bird 2004).

En otros hongos se han reportado diversos factores de transcripción que pertenecen al tipo GATA; éstos se caracterizan por una zona conservada codificante a dedos de zinc que se unen al elemento 5'-GATA-3'; por ejemplo, Fep1 de *Schizosaccharomyces pombe*, Srea de *Aspergillus nidulans*, Sre de *Neurospora crassa*, SreP de *Penicillium chrysogenum* y Urbs1 de *Ustilago maydis* (Voisard, Wang, McEvoy, Xu y Leong 1993; Haas, Angermayr y Stöffler 1997; Zhou, Haas y Marzluf 1998; Haas, Zadra, Stöffler y Angermayer 1999; Pelletier, Beaoudoin, Mukai y Labbé 2002). La regulación del transporte de hierro

mediante estos factores se ve directamente relacionada con la producción y transporte de sideróforos, así como la movilización de hierro libre. Este tipo de factores sensibles al hierro provocan la represión de genes que responden al alto contenido de este ion, por lo que pueden clasificarse como represores transcripcionales contrarios a los factores Aft1 cuya función es la activación de la transcripción de éstos, asegurando que los genes que regulan sean inducidos cuando el organismo presenta una limitación en el hierro (Ruthenford y Bird 2004).

Implicaciones biológicas del hierro en la célula

La importancia del hierro en casi todas las formas de vida radica en su incorporación en las proteínas que catalizan reacciones de gran relevancia, esta adición de Fe puede ser de tres clases. Clase I: ocurre la inserción de hierro en la protoporfirina IX lo que produce un grupo prostético hem esencial en las funciones de todas aquellas células de metabolismo aerobio, algunos ejemplos de este tipo de proteínas son la hemoglobina, la mioglobina o los citocromos (Ponka 1999; Crichton y Pierre 2001). Clase II: ocurre una combinación de Fe y S lo que provoca el ensamble de cofactores inorgánicos conocidos como grupos de hierro y azufre que pueden ser incorporados a las apoproteínas, algunos ejemplos son las ferredoxinas, nitrogenasas e hidrogenasas (Beinert 2000; Lill y Muhlenhoff 2006). Clase III: comúnmente conocidas como proteínas de hierro no hemo, ocurre cuando el Fe se une a la proteína a través de diversos mecanismos. Estas proteínas incluyen ribonucleótido reductasas que son factores limitantes en la síntesis de DNA, oxidasas de hierro no hemo mononucleares y oxigenasas que catalizan reacciones como la biosíntesis de antibióticos (Eklund *et al.* 2001; Bruijninx K *et al.* 2008).

Las propiedades que permiten que el hierro se incorpore en casi cualquier proceso metabólico de la célula son las mismas que en condiciones de exceso de este y presencia de oxígeno propician la catálisis de radicales libres que provocan daño celular. Por lo tanto, las células desarrollan sistemas de regulación de este tipo de moléculas (Bleackley y MacGillivray 2011).

2.3 Metabolismo del cobre

El cobre tiene el número atómico 29, se sitúa en la primera fila del bloque D de la tabla periódica (Figura 1), comúnmente se encuentra en el estado de oxidación Cu (I) y Cu (II) (figura 2). En su estado catiónico monovalente es insoluble por lo tanto no es un estado biodisponible para la célula. En contraste, el estado oxidado (II) se considera el catión divalente con mayor biodisponibilidad ya que al unirse con la forma monovalente generan la tendencia de unirse a moléculas orgánicas formando complejos sensibles a la catálisis mediante oxido reducción (Frausto da Silva y Williams 2001). La propiedad de transferencia de electrones del cobre, le permite que, por mecanismos catalíticos por reacciones de Fenton, forme radicales hidroxilos a partir de H₂O₂ (Valko *et al.* 2005). El cobre se caracteriza por la toxicidad causada en consecuencia a la unión inapropiada al azufre, oxígeno y ligandos de imidazol en las células (Culotta 2010).

El metabolismo del cobre en *S. cerevisiae* es llevado a cabo por cinco genes con funciones particulares cada uno (Figura 4). El primer gen y el que lleva a cabo la mayor parte de la absorción de cobre en la célula es *ctr1* el cual codifica para un transportador transmembranal de alta afinidad regulado por los niveles bajos de cobre intracelular (Dancis *et al.* 1994). *Ctr3* codifica a un segundo transportador transmembranal de cobre de alta afinidad, no obstante, éste no siempre es funcional, se ha encontrado que en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* como la S288C ocurre la inserción de un elemento transponible llamado Ty2 el cual desplaza el promotor de inicio de la transcripción evitando que este se exprese, perdiendo así su funcionalidad (Knight *et al.* 1996). *Ctr2* es un gen homólogo a *ctr3* que codifica a otro transportador de cobre localizado en la membrana vacuolar cuya finalidad es la de movilizar las reservas de cobre almacenadas (Rees *et al.* 2004). *Ctr1*, *Ctr2* y *Ctr3* tienen afinidad por Cu (I), por ende, la acción de estos es dependiente de dos genes: *fre1* y *fre2*, ambos codifican enzimas reductasas que cambian el ion de un estado divalente a uno monovalente (Georgatson y Alexandraki 1994).

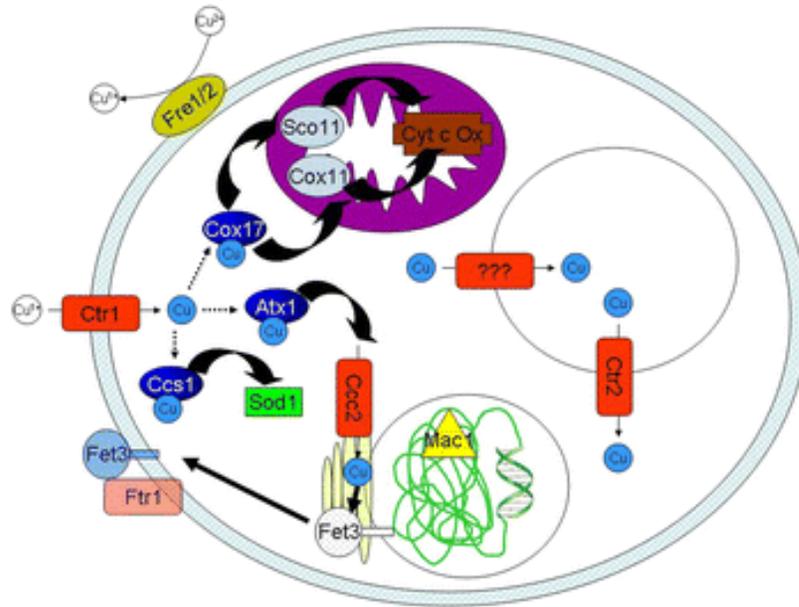


Figura 4. Homeostasis del cobre en *S. cerevisiae*. Los transportadores se muestran en color rojo, las proteínas chaperonas en azul oscuro, los factores de transcripción en amarillo (Bleackley y MacGillivray 2011).

Los cinco genes descritos para el transporte de cobre se encuentran regulados por el factor de transcripción Mac1p el cual es dependiente de cobre promoviendo la transcripción de los genes diana en condiciones de déficit de este ion, por otro lado, en niveles altos de cobre, Mac1p también funciona regulando la degradación de la proteína Ctr1 en la membrana plasmática, siendo uno de los pocos factores que tienen la capacidad de regular la expresión de un gen y su estabilidad como producto (Ooi *et al.* 1996; Labbe 1997; Yonknovick *et al.* 2002).

Una vez que el cobre es internalizado en la célula, existen tres destinos, las vías para cada uno de ellos es seguida por proteínas metalochaperonas encargadas de mantener el equilibrio entre los requerimientos cúpricos de la célula y los efectos perjudiciales que este ion pueda causar, moviendo el cobre desde su ingreso hasta el receptor afín mediante interacciones específicas proteína-proteína (Robinson y Winge 2010; Bleackley y MacGillivray 2011). La proteína Cox17 actúa como chaperona del cobre, ésta lo moviliza desde las reservas a través del citoplasma a las proteínas Sco11 y Cox11 en mitocondria para que sea incorporado en la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna llevando a cabo la reacción de reducción del oxígeno molecular

(Horn *et al.* 2004). La segunda proteína chaperona es Atx1, que tiene actividad en el citosol, entregando el cobre a Ccc2 para que sea incorporada a Fet3, una proteína de transporte de hierro de alta afinidad localizada en el aparato de Golgi. Los genes *ccc2*, *atx1* y *fet3* se encuentran regulados por Aft1. Estos genes representan el vínculo entre el metabolismo del cobre y el hierro demostrando el alto nivel de regulación con el que cuentan estos iones (Fu *et al.* 1995; Yuan *et al.* 1995; Lin *et al.* 1997). La tercera vía del cobre tiene como objetivo proteger a la célula contra el estrés oxidativo, la proteína Ccs1 funciona como chaperona para entregar cobre a Sod19, una enzima superóxido dismutasa citosólica dependiente de Cu y Zn que funciona descomponiendo el superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (Bermingham-McDonogh *et al.* 1988; Bleackley y MacGillivray 2011).

Implicaciones biológicas del cobre en la célula

El cobre forma parte de al menos 30 proteínas extracelulares. Aquellas proteínas que resultan ser citoplasmáticas generalmente se relacionan con la protección y desintoxicación del cobre y la respuesta de la célula ante los niveles cúpricos (MacPherson y Murphy 2007). Las particularidades del cobre han hecho que sea uno de los iones más importante para las reacciones de oxido-reducción de la célula, generalmente relacionadas al metabolismo energético en mitocondrias y cloroplastos (Bleackley y MacGillivray 2011).

La desregulación en los niveles de cobre tiene implicaciones importantes en humanos generando diferentes padecimientos. La concentración promedio de cobre en un individuo sano va desde 1.4 a 2.1 mg/kg. Cuando ocurre una mala absorción de hierro durante el desarrollo ya sea por cirugías, exceso de zinc o malabsorción, las enzimas que requieren de cobre se ven afectadas en su funcionamiento llevando a las células a un aumento en los niveles de estrés oxidativo, a una menor disponibilidad de óxido nítrico, a un metabolismo anormal del hierro y, por consecuencia, a una señalización celular alterada. Estas reacciones tienen efectos a nivel tejido y órganos, principalmente en corazón, cerebro, pulmones y piel (Kumar 2006; Uriu-Adams *et al.* 2010).

Uno de los padecimientos más reportados con relación al cobre es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que es causada por la degradación de las neuronas motoras causando atrofia muscular y pérdida de control de movimiento voluntario. Genéticamente se relaciona a mutaciones hereditarias autosómicas dominantes en el gen *sod1* (Cu/Zn superóxido dismutasa) (Deng *et al.* 1993; Rosen *et al.* 1993). Los cambios en la secuencia del gen *sod1* provocan dificultades en la interacción entre la proteína Sod1 y la proteína chaperona de cobre que incluye a inserción del ion Cu y la oxidación de un enlace disulfuro, los agregados de proteínas inmaduras son los que llevan a la enfermedad (Seetharman *et al.* 2009).

Otro ejemplo de padecimientos relacionados a la homeostasis del cobre es la encefalopatía espongiiforme transmisible o comúnmente llamada enfermedad de las vacas locas, la tembladera de las ovejas y la variante de la enfermedad de Creutzfeld-Jacob en humanos. Ésta es provocada a causa de la presencia de una proteína priónica. En su forma normal, la proteína PrPc transporta cobre intracelular, protegiendo a la célula de estrés oxidativo y amortiguando las variaciones en los niveles de este. Cuando el cobre interacciona con otros iones metálicos como el zinc, el hierro y el manganeso se induce la conversión de la proteína PrPc a la forma de tembladera PrPsc, la unión alterada del ion Cu y la proteína PrPsc contribuyen significativamente en la patología de la enfermedad (Pan *et al.* 1992; Wong *et al.* 2001; Westergard *et al.* 2007; Rana *et al.* 2009).

2.4 Metabolismo del zinc

El zinc es el segundo metal de transición más abundante en todas las formas de vida. Tiene el número atómico 30 y una composición atómica particular (Figura 1); el ion Zn (II) cuenta con el orbital d completo, lo que hace que en condiciones fisiológicas no tenga valencias múltiples y se mantenga como un catión divalente (Figura 2), por lo que no tiene actividad redox y en consecuencia resulta menos tóxico para la célula a comparación de otros iones similares como el hierro y el cobre (Williams 1987; Outten y O'Halloran 2001; Eide 2006).

Por otro lado, el zinc cuenta con una rápida tasa de intercambio de ligandos debido a la alta afinidad electrónica generada por su carga $^{2+}$ y su radio iónico pequeño, lo que

provoca la renovación de productos de reacción útiles para las reacciones de catálisis que incluyen al zinc como un cofactor (McCall *et al.* 2000). Aunque estas dos características no son particularmente destacables, en conjunto, hacen del zinc un elemento de alta biodisponibilidad para su incorporación en una gran variedad de procesos biológicos (Bleackley y MacGillivray 2011).

El metabolismo del zinc en *S. cerevisiae* se lleva a cabo principalmente por dos genes, *zrt1* y *zrt2*. *Zrt1* codifica a la proteína Zrt1, un transportador transmembranal de alta afinidad que se encuentra activo en las células con deficiencia de zinc mientras que *zrt2* codifica a la proteína Zrt2, un transportador transmembranal de baja afinidad el cual es dependiente de concentración, temperatura y tiempo de exposición, regularmente se encuentra activo en células con reservas de zinc (Figura 5) (Zhao y Eide 1996).

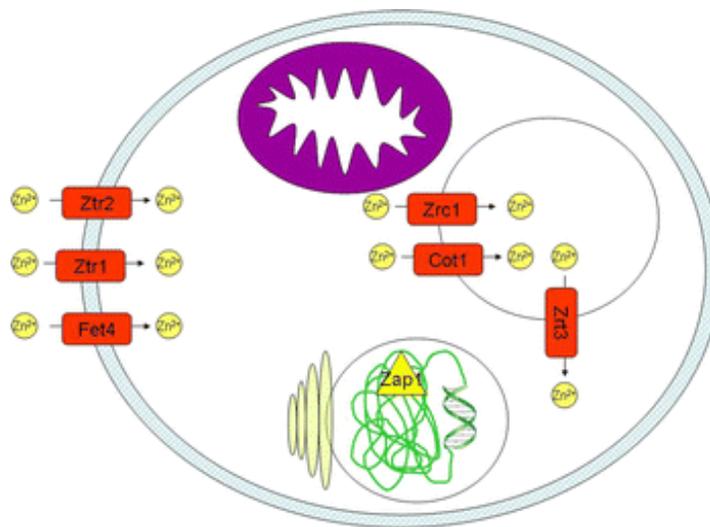


Figura 5. Homeostasis de zinc en *S. cerevisiae*. Se muestran los transportadores en color rojo y los factores de transcripción se muestran en amarillo (Bleackley y MacGillivray 2011).

Aún y cuando los genes *zrt1* y *zrt2* son los más reportados en las vías metabólicas del zinc, el reporte de una cepa de *S. cerevisiae* doble mutante *zrt1*, *zrt2* viable, ayudo a determinar más genes involucrados en menor medida en la homeostasis del zinc entre ellos están los genes *fet4* codificante a la proteína Fet4 y *pho84* que codifica a la proteína Pho84 (Zhao y Eide 1996; Jensen *et al.* 1997; Waters y Eide 2002).

La respuesta a las variaciones en los niveles de zinc intracelular está dada por el factor de transcripción Zap1p el cual se encuentra en el núcleo y es regulado directamente por la unión al zinc tanto en condiciones de abundancia y déficit de este ion, se ha reportado que este factor transcripcional regula más de 80 genes por lo que su función va más allá de ser un simple activador transcripcional (Bird *et al.* 2003; Eide 2009).

Cuando la célula se encuentra repleta de zinc, el excedente comienza su almacenamiento en vacuolas gracias a las proteínas transportadoras Zrc1 y Cot1, siendo ambas, esenciales para la desintoxicación por este metal (MacDiarmid *et al.* 200).

En condiciones de abundancia de zinc, el exceso se almacena en la vacuola de la levadura mediante los transportadores Zrc1 y Cot1 (MacDiarmid *et al.* 2000). Cuando ocurre un cambio de condiciones de un medio de cultivo abundante en zinc a uno con deficiencia, las células con depósitos de zinc llenos tienen la capacidad de replicarse por varias generaciones más a diferencia de aquellas que no cuentan con tales depósitos (Simm *et al.* 2007).

Outten y O'Halloran (2001) sugirieron que existe un sistema de metalochaperonas involucrado en el metabolismo del zinc similar a lo que ocurre con el cobre. Esta idea ha sido refutada debido a que sugiere que por cada molécula de zinc habría una proteína presente lo cual es muy poco probable debido a la abundancia intracelular de este ion, declarando que la regulación de este metabolismo está dada completamente por factores de transcripción (Eide 2006).

Implicaciones biológicas del zinc en la célula

El zinc participa en al menos 300 reacciones enzimáticas relacionadas a distintas funciones (Tapiero y Tew 2003). Por ejemplo, las metaloproteasas de matriz tienen acción en el desarrollo embrionario, la motilidad celular, curación de tejidos, etc. mientras que las carboxipeptidasas funcionan como enzimas digestivas (Hooper 1994; Amalinei *et al.* 2007).

Un gran grupo de proteínas de dedos de zinc que se expresan en eucariontes no tienen actividad enzimática sino de unión a DNA o RNA en donde cada una de ellas puede tener

un motivo de unión distinto, diversificando aún más sus funciones específicas (Klug 2010). Hay proteínas que contienen zinc que no entran en estas categorías, sino que se encuentran en diferentes organismos y funcionan en distintos procesos fisiológicos. Entre estas se incluyen: la fosfatasa alcalina, fosfoliasa C, anhidrasa carbónica, insulina, entre otras. Estudios más recientes han identificado las moléculas de zinc involucradas en la señalización intracelular, similar como ocurre con el calcio (Bleackley y MacGillivray 2011).

Un humano promedio sano contiene aproximadamente 2 g de zinc distribuido en todo el sistema, se presume que el 20-25% de la población mundial tiene deficiencia de zinc (Hambidge y Krebs 2007; Whuheler *et al.* 2005). Mantener los niveles de zinc óptimos es muy importante ya que este está fuertemente involucrado en procesos relacionados al sistema inmune, neutrófilos, macrófagos y células natural killer (Prasad 2009). En general, los mamíferos mantienen el equilibrio del zinc a través de la regulación de la captación intestinal, eliminación fecal de exceso del metal, reabsorción renal, distribución a las células y almacenamiento intracelular (Kambe, Yamaguchi-Iwai, Sasaki, y Nagao 2004). Además de a encontrado que mutaciones en el gen SLC39A4 interrumpe la función del transportador de zinc Zip4 en el intestino, afectando directamente la homeostasis de Zn^{2+} causando acrodermatitis enteropática (Wang *et al.* 2004).

2.5 Regulación de la homeostasis de los metales

La homeostasis de los metales intracelulares comprende de una serie coordinada de procesos de absorción, secuestro, tráfico y almacenamiento de estos iones dentro de la célula, cumpliendo los procesos metabólicos básicos y disminuyendo el daño potencial.

El metabolismo de los metales se lleva a cabo gracias a transportadores específicos, los cuales son codificados por diversas familias mutagénicas (Nies 2003). Se han descrito tres principales familias génicas involucradas en estos procesos. (I) Familia de las ATPasas tipo P: catalizan la absorción y movilización de Cd^{2+} , Cu^{2+} , H^+ , K^+ , Na^+ , Mg^+ y Ca^{2+} en archaeas, bacterias y eucariotas (Bull y Cox 1994; Fagan y Saier 1994). (II) Familia transportadores ABC: transportan Ni^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Mo^{2+} , péptidos y azúcares en archaeas, bacterias y eucariotas (Tam y Saier 1993; Kuan *et al.* 1995). (III) Transportadores RND:

movilizan iones Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} y se han reportado solamente en bacterias (Dinh *et al.* 1994; Saier *et al.* 1994).

Desde la caracterización de estas familias mutagénicas a la fecha se han reportado diversos transportadores de metales pesados los cuales no pertenecen a los grupos establecidos formando nuevas familias de transportadores transmembranales específicos, incluyendo para cromo, cobre, mercurio y otros iones.

2.6 Transportadores CDF

Los transportadores que forman parte de la familia de facilitadores de difusión de cationes fueron descubiertos e identificados por Nies y Silver (1995) quienes los describen como proteínas transmembranales presentes en archaeas, bacterias y eucariotas, involucradas en el transporte de cationes como zinc, cobalto y cadmio dotando a los organismos con una tolerancia incrementada a la presencia de estos cationes.

Los sustratos reportados de las proteínas CDF son cationes metálicos divalentes como Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} y Mn^{2+} o de un radio atómico desde 72 pm (Zn^{2+}) hasta 97 pm (Cd^{2+}) (Nies 2003); La mayoría de los CDF reportados trabajan con un sistema de transporte de dos flujos $\text{Metal}^{2+}/\text{H}^+(\text{K}^+)$ que cataliza el eflujo de cationes metálicos de transición del citoplasma hacia el exterior de la célula o compartimentos sub celulares (Figura 6) (MacDiarmid, Milanick, y Eide 2002; Guffanti, Wei, Rood y Krulwich 2002; Chao y Fu 2004; Grass *et al.* 2004).

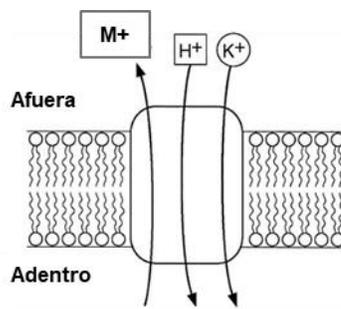


Figura 6. Sistema de transporte transmembranal antiportador.

Topología de los transportadores CDF

Las proteínas reportadas como parte de la familia CDF cuentan regularmente con seis dominios transmembranales denominados “TMD I-VI” y sus extremos C-terminal y N-terminal se encuentran orientados hacia el citoplasma (Figura 7) (Wei y Fu 2005; Montanini, *et al.* 2007).

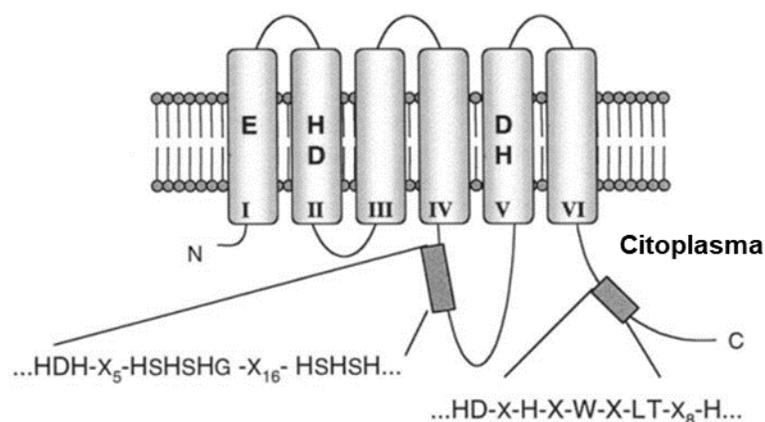


Figura 7. Predicción de la topología transmembranal de las proteínas CDF (Gaither y Eide 2001).

Paulsen y Saier (1997) propusieron una secuencia característica entre los dominios TMDI y TMDII, así como, un dominio de salida de cationes en el extremo C-terminal como parte presente en todos los miembros de la familia CDF. Dentro de las secuencias proteicas correspondientes a los TMD anfipáticos I, II, V y VI existen una alta conservación ya que posiblemente son los responsables en el transporte de metales (Haney, Grass, Franke, y Rensing 2005). No obstante, algunos miembros de la familia CDF reportados han exhibido diferencias significativas a nivel de su estructura secundaria, algunos ejemplos son la proteína Msc2 de *S. cerevisiae* la cual cuenta con 12 TMD o la proteína ZnT5 de los humanos muestra 15 TMD (Kambe *et al.* 2002; Cragg *et al.* 2002).

Generalmente los transportadores de ésta familia contienen una región rica en histidina ubicada entre el TMD IV-V y en el extremo N y/o C-terminal (Figura 7), dichas regiones se cree tienen la capacidad de unirse a los metales (Cd^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} , entre otros) aunque pueden localizarse en otras zonas, por ejemplo en Zrg17 localizada en RE contiene ésta región entre el TMD III y TMDIV ubicada hacia la luz del RE mientras que Shcdf8 de *Stylosanthes hamata* no contiene dominios ricos en histidina, dicha variación se relaciona

directamente a la afinidad del transporte iónico (Delhaize, Kataoka, Hebb, White y Ryan 2003; Mäser *et al.* 2002).

Estudios con el gen *znt4* en ratas han demostrado que los transportadores CDF también se han asociado a complejos homo-oligoméricos o complejos hetero-oligoméricos interactuando directamente con otras proteínas que necesitan de cationes metálicos para su funcionamiento (Murgia, Vespignani, Cerase, Nobili, y Perozzi 1999; Blaudez, Kohler, Martin, Sanders y Chalot 2003; Ellis, MacDiarmid y Eide 2005).

Localización de los transportadores CDF

La localización de las proteínas transportadoras transmembranales de la familia CDF es un tema controversial debido que no se conserva dentro de los diversos subgrupos. El grupo de transportadores reportados para Fe^{2+} y Zn^{2+} tiene mayor presencia en procariotas (archaeas y bacterias) y en hongos. En procariotas suelen asociarse a membranas plasmáticas mientras que, en plantas, los transportadores de zinc (AtMTP1 y PtdMTP1) se localizan en tonoplasto o en membrana plasmática (Li y Kaplan 1997; Grass *et al.* 2005; Munkelt, Grass y Nies 2005; Desbrosses-Fonrouge 2005). En mamíferos, los genes caracterizados son exclusivos de vesículas citoplasmáticas (Palmiter, Cole y Findley 1996; Palmiter, Cole, Quaife y Findley 1996; Huang y Gitschier 1997).

En levaduras también ocurre la diversidad funcional, mientras que en *S. cerevisiae* se han reportado los genes *zrc1* y *cot1* en las membranas de las vacuolas, en *S. pombe* se ha localizado el gen *zhfl* en retículo endoplasmático (Clemens *et al.* 2002).

Importancia del estudio de los transportadores CDF

En los últimos 10 años el estudio de los mecanismos moleculares que ocurren a través de las membranas celulares se ha visto enriquecido gracias a la generación y aplicación de nuevas tecnologías de análisis genómicos y moleculares, ampliando el panorama del conocimiento y brindando un abanico de posibilidades de aplicación.

La mayoría de las estrategias reportadas se ven orientadas hacia el área de la biorremediación, fitorremediación, manipulación genética de ciertas especies, la nutrición

mejorando la calidad de ciertos cultivos y la salud humana (Hall y Williams 2003; Nies 2003; Kambe, Yamaguchi-Iwai, Sasaki y Nagao 2004).

Kambe y colaboradores (2004) reportaron los efectos perjudiciales de la deficiencia catiónica en organismos eucariotas superiores, por ejemplo, una mala absorción de zinc producto de alteraciones en los sistemas de transporte, provoca deficiencia en el crecimiento, actividad inmune deficiente y funciones cerebrales atrofiadas en mamíferos.

Nies (2003) reportó la baja expresión del gen *znt3* que codifica a un transportador de zinc en vesículas, causada por la edad en humanos conduce a la deficiencia de Zn^{2+} en las vesículas sinápticas de la vía de la fibra musgosa e induce citotoxicidad glutamatérgica en las neuronas del hipocampo y el deterioro del aprendizaje y la memoria, además de que el gen *znt4* el cual es muy similar al anterior en topología y función, también se expresa en epitelio mamario y resulta el responsable de la excreción de zinc en la leche materna, la delección de este gen provoca un déficit nutricional en este alimento.

El estudio basado en las técnicas genómicas como la comparación de secuencias para la identificación de los transportadores, la complementación funcional en diversos organismos para la generación de cepas mutantes y la caracterización de la respuesta fenotípica ante la ausencia o sobreexpresión del gen han permitido la identificación de una amplia variedad de genes de esta familia y se ha podido relacionarlos a padecimientos clínicos y a diversas problemáticas actuales (Hall y Williams 2003).

2.7 Especificidad vs diversidad del transporte

La comparación de los diversos sistemas de transporte involucrados en la homeostasis de los metales demuestra que la tolerancia a metales pesados no es más que el resultado de múltiples capas de sistemas homeostáticos con especificidades de sustrato sobrepuestas, pero funciones únicas (Nies 2003).

Investigaciones recientes han tratado de caracterizar la forma en que los transportadores miembros de la familia de eflujo de cationes (CDF) se unen a los iones y los transportan a través de las membranas. Algunos de los resultados generados a partir de la complementación de aminoácidos funcionales clave han revelado que la especificidad del

sustrato reside en las tres α -hélices transmembranales anfipáticas conservadas II, V, VI las cuales estructuralmente conforman el núcleo interno que da lugar al canal de paso del ion (Wei y Fu 2005; Haney, Grass, Franke y Rensing 2005; Anton *et al.* 2004; Lee *et al.* 2002).

Los transportadores de la familia CDF han sido subdivididos en tres grupos principales con base en su especificidad hacia el metal transportado (Zn^+ , Fe/Zn^+ y Mn -CDF) (Montanini *et al.* 2007). El grupo 1 contiene dos subgrupos, 1a y 1b. El grupo 1b está conformado por proteínas de gran tamaño (~750 aa) como ZnT5, ZTL1 y Msc2, mientras que el grupo 1a relaciona un mecanismo común en función y no en estructura (Tabla 1).

Tabla 1. Grupos de los transportadores CDF descritos en diferentes organismos

Grupos de proteínas CDF			
Nombre	Ocurrencia	Sustrato predictivo ^a	Ejemplos ^b
CDF1			
1 a	Proteobacteria (α , β , γ)	Zn^{2+} ?	Pa1297
1 b	Bacterias, levaduras, mamíferos	Zn^{2+}	Msc2, ZnT5, Ztl1, ZnT7
CDF2			
2 a	Crenarchaeota	$Zn^{2+}????$	Pae2715
2 b	Eucariotas, bacterias flexibles, bacterias gram positivas	$Zn^{2+}???$	Spr1672
2 c	Bacterias y euriarchaeotas termofilicas	$Zn^{2+}??$	Ph0896
2 d	Eucariotas multicelulares	Zn^{2+} , (Ni^{2+})	Zat, ZnT2 y 3
2 e	Proteobacterias y cianobacterias	$Zn^{2+}?$	All7610
2 f	Bacterias gram positivas	$Zn^{2+}?$	Sa0155
2 g	Bacterias	Zn^{2+}	ZitB, CzcD_Bacsu
2 h	Bacterias	Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}	CzcD_Ralme
CDF3			
3 a	Bacterias	Desconocido	Aq_2073
3 b	Proteobacterias (α , δ)	Desconocido	YiiP
3 c	Bacterias	Desconocido	Dr1236
3 d	Bacterias gram positivas de bajo contenido G+C	Desconocido	EF0859
3 e	Termotoga y bacterias gram positivas de bajo contenido G+C	Desconocido	YeaB, YbdO
3 f	Procariotas	Fe^{2+} ?	MamB

^a: El número de signos de interrogación después del sustrato predictivo indica la probabilidad de la predicción; a mayor cantidad de signos de interrogación menor es la probabilidad del sustrato putativo.

^b: Las secuencias representativas son de *Pseudomonas aureginosa* (Pa1297), *S. cerevisiae* (Msc2), *Pyrobaculum aerophilum* (Pae2715), *Streptococcus pneumoniae* (Spr1672), *Pyrococcus horikoshii* (Ph0896), *Arabidopsis thaliana* (Zat), mamíferos (ZnT2, ZnT3, ZnT5, ZnT7, Ztl1), *Nostoc* (All7610), *Staphylococcus aureus* (Sa0155), *Escherichia coli* (ZitB, YiiP), *Bacillus subtilis* (CzcD_Bacsu, YeaB, YbdO), *R. metallidurans* (Czc_Ralme), *A. aeolicus* (Aq_2073), *D. radiodurans* (Dr1236), *Enterococcus faecalis* (Ef0859), *Magnetococcus gryphiswaldensis* (MamB).

Traducido de Paulsen y Saier 1996

El diámetro del sustrato de las proteínas CDF es un factor importante para la especificidad del transporte, comúnmente los cationes que transporta incluyen Fe^{2+} (76 pm), Co^{2+} (74 pm), Ni^{2+} (72 pm), Zn^{2+} (74 pm) y Cd^{2+} (97 pm). Otros cationes como Mg^{2+} (65 pm) y Cu^{2+} (69 pm) pueden resultar muy pequeños mientras que Ca^{2+} (99 pm) y Hg^{2+} (110 pm) son demasiado grandes, sin embargo, el Mn^{2+} puede llegar a filtrarse ya que su radio (80 pm) se incluye dentro del rango (Crag *et al.* 2002). La mayoría de los metales que transportan las proteínas CDF son cationes metálicos divalentes del primer periodo, aun y cuando el promedio de diámetros es de 74 ± 2 pm el cadmio al ser similar al Zn^{2+} puede ser transportado.

Estructuralmente la mayoría de los transportadores CDF tienen un tamaño de 300 a 400 aminoácidos que conforman seis dominios transmembranales con residuos de histidina cuya estructura involucra la unión de dos o tres iones de Zn^{2+} por polipéptido (Montanini *et al.* 2007).

Las proteínas CzcD de *Bacillus subtilis* y ZitB de *Escherichia coli* funcionan a partir del impulso de la fuerza motriz de protones o de gradientes de potasio, Zrc1 de *S. cerevisiae* también requiere de un gradiente de protones, curiosamente en eucariotas no todas las membranas albergan este tipo de gradientes (protones, sodio, potasio). Anton y colaboradores (2004), sugirieron que algunas proteínas CDF funcionan a través del transporte facilitado mediante difusión simple.

En resumen, el transporte de cationes por las proteínas CDF podría actuar como un sistema de transporte de dos flujos contra un gradiente quimiosmótico o una difusión facilitada por el gradiente de concentración del catión.

2.8 Transporte de metales en *Yarrowia lipolytica*

***Yarrowia lipolytica* propuesta como modelo de estudio de transporte de metales**

El grado de conservación del genoma de las levaduras y los humanos es alto, lo que ha permitido que se caractericen múltiples genes involucrados en el metabolismo de los metales de transición. *S. cerevisiae* es por excelencia el modelo de estudio para el metabolismo eucariota, esta levadura tiene múltiples ventajas como un ciclo de vida fácil

y rápido que permite su análisis de manera eficiente utilizando la genética clásica y la manipulación genómica (Goffeau *et al.* 1996).

La principal ventaja de *S. cerevisiae* es el estado de la secuenciación y anotación de su genoma. Haciendo una comparativa del genoma humano y el genoma de *Saccharomyces* existen diferencias significativas en base a su tamaño y compactación, mientras que el genoma humano tiene un 5% de elementos codificantes, las levaduras mantienen un 70% de ORFs debido a la carencia de elementos no codificantes como intrones (Goffeau *et al.* 1996; Lander *et al.* 2000).

En diversos estudios, el análisis de genes en las levaduras ha llevado a la identificación y caracterización genética y bioquímica de los elementos del genoma, asociando así los equivalentes homólogos en humanos (Tabla 2). Esto ha permitido generar grandes avances en la investigación en salud humana. Aún y con las ventajas antes descritas existen mecanismos que son diferentes entre levaduras y humanos, por ejemplo, en los estudios con metales de transición, se sabe que en las levaduras en altas concentraciones de metales estos se almacenan en vacuolas para su uso cuando las condiciones cambian a desabastecimiento, contrario a esto, en humanos existen mecanismos distintos para el metabolismo de los metales. El cobre y el zinc necesitan de las metalotioneinas ricas en cisteína, estas tienen un homólogo en levaduras sin embargo la función no es la misma. El hierro se almacena en las proteínas ferritinas mientras que *Saccharomyces* no cuenta con proteínas similares (Li *et al.* 2001; Bleackley y MacGillivray 2011).

Tabla 2. Genes homólogos de levadura encontrados en humanos con actividad relacionada en la homeostasis de metales de transición

Gen de levadura	Homólogo en humanos	Función
<i>zrt1</i> (Eide, 2004)	Familia de transportadores SLC39	Transporte de zinc y otros metales desde el espacio extracelular o lumen de los organelos hacia el citoplasma.
<i>smf1</i> (Portnoy <i>et al.</i> 2000)	<i>dmt1</i>	Transporte de metales divalentes
<i>yfh1</i> (Wilson & Roof, 1997)	Frataxina	Regulación de la disponibilidad de hierro mitocondrial.
<i>atx1</i> (Klomp <i>et al.</i> 1997)	<i>hah1</i>	Chaperona citosólica de cobre hacia el aparato de Golgi.
<i>fet3</i>	Hefaestina/ceruloplasmina	Ferroxidasa implicada en la homeostasis del hierro.
<i>mrs3/4</i> (Shaw <i>et al.</i> 2006)	Mitoferina	Transportador de hierro de membrana mitocondrial
<i>ccc2</i> (Yuan <i>et al.</i> 1995)	Proteína Wilson's Menke's	Transportador de cobre en aparato de Golgi
<i>bsd2</i> (Howitt <i>et al.</i> 2009)	<i>ndfip1</i>	Regulador de SMF1/DMT1
<i>ctr1</i> (Puig <i>et al.</i> 2002)	<i>ctr1</i>	Transportador de cobre de membrana plasmática
<i>pmr1</i> (Ton <i>et al.</i> 2002)	<i>Spcal/2</i>	ATPasa transportadora de manganeso y calcio hacia el aparato de golgi

Traducido de Bleackley y MacGillivray 2011

Yarrowia lipolytica es una de las levaduras de mayor interés en la actualidad debido a sus diferencias genóticas y fenotípicas con las levaduras más estudiadas: *S. cerevisiae* o *S. pombe*. Entre sus capacidades destaca la tolerancia a condiciones que para cualquier otro organismo resultarían letales, un ejemplo es la capacidad de crecer rápidamente en condiciones desfavorables como rangos de pH muy amplios, soportando desde pH 3.0 hasta pH 10.0, lo cual la dota de una ventaja muy grande cuando se desea cultivar, pudiendo utilizar dicha característica para aislarla de otros organismos y favorecer su proliferación (Nicaud 2012). Además de esto, su crecimiento rara vez se ve limitado por el medio de cultivo ya que cuenta con la capacidad de usar un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono, propiedad que la mayoría de los organismos no tiene y *Yarrowia* explota aumentando así su habilidad competitiva con otras comunidades microbianas (Sekova, Isakova, y Deryabina 2015). Su genoma alberga 1229 genes únicos de este género, 1083 genes compartidos con *S. cerevisiae* y 146 con otras especies. El análisis funcional de los genes únicos de *Yarrowia* revelan nuevas vías de transporte de moléculas, homeostasis de iones y rutas metabólicas (Casaregola *et al.* 2000).

El estudio de otros genomas aportaría implicaciones novedosas en el metabolismo de los metales de transición, facilitando los avances en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades que involucran el transporte de metales y los mecanismos de homeostasis.

Proteína Dmct: Divalent Metal Cation Transporter

Desde que la familia CDF fue caracterizada en 1995, se han descrito y caracterizado otros genes basados en la similitud del dominio característico, en los últimos años y con el avance de las tecnologías de secuenciación y anotación de genomas, el número de miembros de esta familia ha aumentado exponencialmente.

La inserción de más proteínas a la familia CDF se ha realizado de diversas maneras, en un inicio se buscaba un motivo particular en la secuencia, fue así como se agruparon los 13 primeros miembros, eventualmente, los investigadores se dieron cuenta que esta región resultaba restrictiva a otras proteínas que parecía pertenecían también a la misma clase de transportadores, generando así la segunda estrategia en donde se usaron alineamientos múltiples de las secuencias aminoacídicas evaluando el extremo C-terminal e incluyendo

una glicina que se encuentra altamente conservada acompañada de cinco aminoácidos río abajo (Montanini *et al.* 2007).

En el presente trabajo se planteó el objetivo de caracterizar la función de la proteína Dmct (Yali0F19734p) en *Y. lipolytica* a partir de la comparación de la cepa P01A respecto a una cepa mutante generada por la delección del gen *dmct-Yali_F19734g* y la inserción del gen marcador *Ura3*. En estudios previos por nuestro equipo de trabajo, se caracterizó el gen *dmct* como un exón de 1668 nucleótidos que codifica a la proteína Dmct de 555 aminoácidos. Estructuralmente la proteína cuenta con tres dominios funcionales: dominio transportador de cationes metálicos divalentes (Aminoácido 265-243; CDD: 223131), dominio de la súper familia de proteínas de eflujo de cationes (Aminoácido 278-463; CDD: 279834) y dímero de transporte de zinc (Aminoácido 587-543; CDD: 293521) (González-Lozano 2017). Basándonos en la arquitectura de los dominios funcionales y mediante alineamientos de secuencias múltiples se estableció la homología de esta proteína con otros miembros de la familia CDF (Tabla 3).

Tabla 3. Homólogos de la proteína codificada por el gen *dmct* de *Y. lipolytica* (González-Lozano 2017)

Proteína	Función	Acceso NCBI	Organismo	Longitud (aa)
Dmct	Posible transporte de cationes divalentes metálicos	XP_505634	<i>Yarrowia lipolytica</i>	555
Cot1	Transporta cationes metálicos en vacuola, resistencia a cobalto y rodio, respuesta a estrés.	NP_014961.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	439
Zcr1	Resistencia a zinc y cadmio	CAB56542.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	442
Mmt1p	Transporte de zinc	NP_013902.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	510
Zrg17	Transporte de zinc en retículo endoplasmático	CAQ43236.1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	634
Msc2	Homeostasis del zinc, influjo de zinc al retículo endoplásmico	NP_010491.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	725
Proteína mitocondrial de transporte de metales	Acumulación de hierro en mitocondria	EDN64111.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	510
Proteína de respuesta a estrés por toxicidad de cobalto	Transporte vacuolar de zinc. Resistencia a cobalto y rodio.	EDN63640.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	439
Proteína transportadora facilitadora de difusión de cationes	Transporte de hierro, cobre, zinc y cadmio	KGR02339.1	<i>Candida albicans</i>	616
Proteína Transportadora de cationes metálicos	Eflujo de iones de cobre, zinc y cadmio	XP_715441.1	<i>Candida albicans</i>	626
Proteína de resistencia a zinc y cadmio	Eflujo de cobre, zinc y cadmio	XP_001528583.1	<i>Lodderomyces elongisporis</i>	474
Proteína mitocondrial relacionada a ala acumulación de hierro	Acumulación de hierro	XP_001387461.2	<i>Schefferomyces stipitis</i>	430
Proteína de resistencia a zinc y cadmio	Eflujo de cobre, zinc y cadmio	XP_002494345.1	<i>Komagataella phaffii</i>	459

Topológicamente se reportó una estructura predictiva de la proteína Dmct en la que se identifican seis regiones alfa hélice unidas a tres laminas beta plegadas, similar a la estructura de las proteínas homologas que forman parte de la familia CDF (Figura 8), la predicción fue realizada a partir de la similitud de la secuencia aminoacídica con proteínas cuya estructura se ha definido por medios experimentales (González-Lozano 2017).

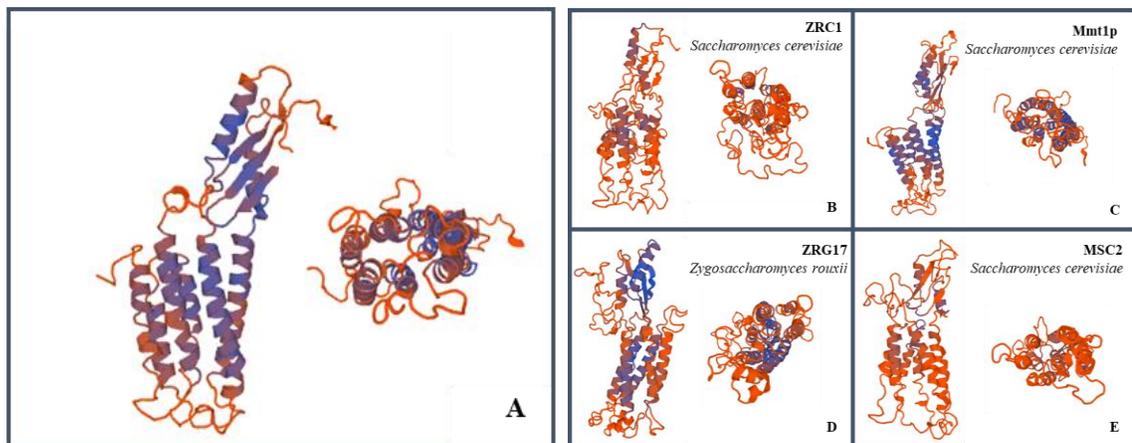


Figura 8. Modelado predictivo de la estructura 3D de la proteína Dmct de *Y. lipolytica* realizado con SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.* 2018). A. Vista frontal de la proteína que muestra seis estructuras de α -Hélice en la parte inferior y dos más en la parte superior acompañadas de tres láminas plegadas β . Vista inferior de la estructura de la proteína que muestra el pasaje de los iones metálicos. B-D. Vista frontal e inferior del posible homólogo a *dmct*.

Partiendo de estos antecedentes, en el presente trabajo se pretende caracterizar experimentalmente la función de la proteína Dmct realizando un análisis comparativo entre la respuesta fisiológica de la cepa P01A de *Y. lipolytica* contra la cepa mutante Δ Dmct para identificar el tipo de iones que esta proteína es capaz de transportar, así como la respuesta celular (crecimiento y morfología) ante la presencia y/o ausencia de este transportador.

III. JUSTIFICACIÓN

Yarrowia lipolytica es una levadura de gran importancia en procesos biotecnológicos que, al no ser una especie patógena para humanos, ha sido aprobada para diversos procesos industriales como un microorganismo GRAS (Generally Recognized As Safe), lo que permite describir procesos y manipular vías metabólicas para extrapolar los conocimientos adquiridos a sistemas mas complejos (Kurtzman 1998).

Su nicho ecológico abarca desde alimentos ricos en lípidos hasta aguas residuales, dicha versatilidad ha provocado una rápida evolución de su especie respecto a otros ascomycetos. Su genoma comprende un total de 4940 genes de los cuales al menos 1229 son genes nuevos, 1083 son genes con homología en *S. cerevisiae* y 146 con homología en diferentes genomas. Se ha reportado que los genes que son exclusivos de *Yarrowia* son los responsables de aumentar considerablemente algunos procesos descritos en *S. cerevisiae* como diversas actividades enzimáticas, actividades de transporte, homeostasis de iones y la actividad de diversas vías metabólicas (Casaregola *et al.* 2000). El sistema de transporte de iones se encuentra particularmente sobrerrepresentado en el genoma de *Y. lipolytica*, sin embargo, aún no se han descrito las vías de transporte, acumulación y movilización de éstos, haciéndola una candidata viable para la descripción de nuevos genes involucrados en la movilización de moléculas.

En el presente trabajo se describe la función de un posible transportador de metales, así como la posible vía por la cual *Y. lipolytica* transporta iones metálicos de Cu, Fe y Zn, buscando comprender el transporte ionico en levaduras y ampliar el conocimiento para su extrapolación en sistemas biológicos superiores.

IV. HIPÓTESIS

El gen *dmct* (*Yali_F19743g*) de *Y. lipolytica* codifica para una proteína de transporte transmembranal específico de metales catiónicos divalentes.

V. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Caracterizar la función y especificidad en el transporte de iones de la proteína codificada por el gen *dmct* (Yali0F19743p) de *Y. lipolytica*.

5.2 Objetivos particulares

- Análisis de enriquecimiento de la proteína codificada por el gen *dmct* de *Y. lipolytica*.
- Generar la cepa complementaria (RDmct) de la cepa Δ Dmct de *Y. lipolytica*.
- Determinar la participación de la proteína codificada por el gen *dmct* en el crecimiento y morfología de las células de *Y. lipolytica* cultivadas en presencia o ausencia de diferentes cationes divalentes.
- Identificar la especificidad en el transporte de iones de la proteína codificada por el gen *dmct*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

ETAPA 1

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Con el objetivo de analizar la información correspondiente a la proteína codificada por el gen *dmct*, se realizaron los siguientes ensayos, utilizando la información y herramientas de bioinformática disponibles en las bases de datos:

6.1 Predicción de la localización subcelular

Para predecir la localización subcelular de la proteína Dmct, se ingresó la secuencia aminoacídica correspondiente en formato fasta y en código de una sola letra al software Wolf PSORT disponible en <https://www.genscript.com/wolf-psort.html> utilizando los parámetros preestablecidos para hongos.

6.2 Predicción de la topología transmembranal

Para predecir presencia y ubicación de hélices transmembranales en la proteína Dmct, se ingresó la secuencia aminoacídica en formato fasta y en código de una sola letra al software TMHMM-2.0 disponible en <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0> utilizando los parámetros preestablecidos.

6.3 Análisis filogenético y predicción de proteínas ortólogas

Para tratar de establecer el origen filogenético del gen *dmct*, así como sus posibles ortólogos, se introdujo el nombre sistémico dado por la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>) para la proteína codificada por el gen *dmct* (*q6c128_Yarli*) en el software PhylomeDB, disponible en <http://phylomedb.org/> utilizando los parámetros preestablecidos.

6.4 Análisis de similitud a nivel de aminoácidos

Para establecer el porcentaje de similitud de la proteína Dmct con sus posibles homólogos se descargaron las secuencias aminoacídicas completas en formato fasta de la base de

datos NCBI y se realizó el alineamiento de secuencias múltiples con el programa BioEdit V7.0 disponible para descarga en https://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/Trace_viewer_reviews/BioEdit/ utilizando el algoritmo de Clustal W.

Para establecer el porcentaje de similitud del dominio CDF de la proteína Dmct respecto al dominio CDF de las proteínas posibles homólogas, se utilizó la base de datos de dominios conservados (CDD) de NCBI, disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> para delimitar la región correspondiente a éste, posteriormente, se realizó un alineamiento con el programa BioEdit utilizando el algoritmo Clustal W.

6.5 Análisis de la región reguladora del gen *dmct*

Para describir la posible regulación del gen *dmct* se accedió a la secuencia completa del cromosoma F de *Y. lipolytica* disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_006072.1 y se delimitaron 1000 pb río arriba del gen *dmct* (*Yali0f19734g*), se descargó la secuencia nucleotídica en formato fasta y se ingresó en el software Yeastract que tiene como función encontrar los sitios de unión de factores de transcripción con base en secuencias consenso, disponible en <http://www.yeastract.com/findregulators.php>.

6.6 Análisis de posibles genes con actividad compensatoria a *dmct*

Para la búsqueda de posibles genes involucrados en el transporte de metales que pudieran estar implicados en la actividad compensatoria de la célula ante la ausencia del gen *dmct* se realizó una búsqueda manual en el genoma de *Y. lipolytica* disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/194>. Se seleccionaron todos aquellos genes que contenían en su arquitectura algún dominio perteneciente a las familias de proteínas transportadoras de metales.

ETAPA 2

GENERACIÓN DE LA CEPA COMPLEMENTARIA Y ANÁLISIS GENOTÍPICO DE LAS CEPAS

6.7 Material biológico

Para este trabajo se utilizaron las cepas P01A (MatA, *Ura3*⁻, *Leu2*⁻) y Δ Dmct (MatA, *Ura3*⁺, *Leu2*⁻, *dmct*⁻) de *Y. lipolytica* las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Publica de Facultad de Nutrición y Salud Publica de la UANL a cargo del Dr. Eduardo Campos Góngora. Las cepas fueron activadas en placas de medio YPD e incubadas a 28°C por dos días.

6.8 Preparación de medios de cultivo y soluciones

Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua desionizada y éstas se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 lbs de presión durante 20 minutos, a menos que algo mas se indique.

- **Medio YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose)**

Para preparar 1L del medio YPD se pesaron y mezclaron 10 grs de extracto de levadura (BD Bacto CAS: 212750), 20 grs de peptona bacteriológica (MCD LAB CAT: 9221), 20 grs de dextrosa (CTR CAT; CTR02348), en caso de necesitar el medio en estado sólido, se agregaron 20 grs de agar bacteriológico (BD Bioxon LOT: 7220553 REF: 215000) finalmente, se adicionó el agua necesaria para llegar al volumen final.

- **Medio YNB (Yeast Nitrogen Base)**

Para preparar 1L de medio YNB se pesaron y mezclaron 6.7 grs de medio YNB sin aminoácidos con sulfato de amonio (BD Difco LOT: 6271873 REF: 291920) y 5 grs de dextrosa (CTR CAT; CTR02348), en caso de necesitar el medio en estado sólido, se agregaron 20 grs de agar bacteriológico (BD Bioxon LOT: 7220553 REF: 215000). Se aforó a la mitad del volumen final obteniendo una concentración 2X. Una vez esterilizado y temperado, se adicionaron los componentes termolábiles como uracilo (SIGMA CAS:

66-22-8) (22.4 mg/L), leucina (Jalmek CAS: 61-90-03) (262 mg/L) y 5'FOA (GoldBio CAT: F-230) (1µg/ml) según el procedimiento experimental. El medio se aforó nuevamente con agua desionizada estéril para obtener la concentración 1X.

- **Medio mínimo mineral (MM)**

Para preparar 1 L del medio mínimo mineral se pesaron y mezclaron 3 grs de nitrato de amonio (CTR CAT: CTR03540), 10 grs de dextrosa (CTR CAT: CTR02348) y 62.5 mL de la solución de sales. El pH se ajustó a 7.0, en caso de necesitar el medio en estado sólido, se agregaron 20 grs de agar bacteriológico (BD Bioxon REF: 215000).

Para las modificaciones posteriores en el medio mínimo mineral se preparó un stock del medio a una concentración 2X siguiendo la misma relación de los reactivos, sin agregar la solución de sales/elementos traza y adicionando la mitad del volumen final de agua desionizada.

- **Elementos Traza**

Para preparar 1 L de solución de elementos traza se pesaron y mezclaron 0.06 grs de ácido bórico H_3BO_3 (Armstrong Biosciences), 0.14 grs de cloruro manganoso $MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$ (Jalmek CAS: 13446-34-9), 0.4 grs de cloruro de zinc $ZnCl_2$ (Jalmek CAS: 7646-85-7), 0.04 grs de molibdato de sodio Na_2MoO_4 (CTR CAT: CTR03440), 0.1 gr de cloruro férrico $FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$ (Jalmek CAS: 10025-77-1) y 0.4 grs de sulfato cúprico $CuSO_4 \cdot 5(H_2O)$ (Jalmek CAS: 7758-99-8). Finalmente, se adicionó el agua necesaria para llegar al volumen final.

- **Solución de sales**

Para preparar 1 L de solución de sales se pesaron y mezclaron 16 grs de fosfato de potasio KH_2PO_4 (Jalmek CAS: 7778-77-0), 4 grs de sulfato de sodio Na_2SO_4 (J. T. Baker CAS: 7757-83-7), 8 grs de cloruro de potasio KCl (Fisher Chemicals CAS: 7447-40-7), 2 grs de sulfato de magnesio $MgSO_4$ (Jalmek CAS: 100034-99-8), 1 gr de cloruro de calcio $CaCl_2$ (Jalmek CAS: 10043-52-4) y 8 mL de la solución de elementos traza.

Para los experimentos en medio sólido y líquido adicionado con diferentes concentraciones de cationes, se realizaron algunas modificaciones en la preparación de los medios base YNB y MM antes descritos.

- **Medio YNB sólido modificado con distintas concentraciones de calcio, cobre, zinc y hierro**

Para preparar el medio YNB sólido adicionado con las distintas concentraciones de cationes, se utilizaron las soluciones de medio YNB 2X (adicionado con agar bacteriológico), leucina 10X, uracilo 10X, cloruro de calcio 8 M, sulfato de cobre 100 mM, sulfato de zinc 100mM o sulfato de hierro 100 mM según el ion de interés y agua desionizada (Grado milliQ) que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 4. Formulaciones de medio YNB sólido con diferentes concentraciones calcio, cobre, zinc y hierro.

Concentración final (mM)	Volumen final (ml)	YNB 2X (ml)	CaCl ₂ 8M (ml)	Ura 10X (ml)	Leu 10X (ml)	H ₂ O (ml)
800			2.5			5
825			2.57			4.93
850	25	12.5	2.65	2.5	2.5	4.85
875			2.73			4.77
900			2.81			4.69
CuSO₄ 100 mM						
2.0			0.5			7
2.5			0.62			6.88
3.0	25	12.5	0.75	2.5	2.5	6.75
3.5			0.87			6.63
4.0			1			6.5
ZnSO₄ 100 mM						
16			4			3.5
17			4.25			3.25
18	25	12.5	4.5	2.5	2.5	3
19			4.75			2.75
20			5			2.5
FeSO₄ 100 mM						
6.0			1.5			6
6.5			1.62			5.88
7.0	2.5	12.5	1.75	2.5	2.5	5.75
7.5			1.87			5.63
8.0			2			5.5

El medio se homogenizó y vertió en placas Petri de 90 x 15 mm para su uso.

- **Medio YNB líquido modificado con distintas concentraciones de calcio, cobre, zinc y hierro**

Para preparar el medio YNB líquido adicionado con las distintas concentraciones de cationes, se utilizaron las soluciones de medio YNB 2X, leucina 10X, uracilo 10X, cloruro de calcio 4 M, sulfato de cobre 100 mM, sulfato de zinc 100mM o sulfato de hierro 100 mM según el ion de interés y agua desionizada (Grado milliQ) en los volúmenes que se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Formulaciones de medio YNB líquido con diferentes concentraciones calcio, cobre y zinc.

Concentración final (mM)	Volumen final (ml)	YNB 2X (ml)	CaCl₂ 8M (ml)	Ura 10X (ml)	Leu 10X (ml)	H₂O (ml)
650			81.24			68.76
700	500	250	87.5	50	50	62.5
750			93.74			56.26
800			100			50
CuSO₄ 100 mM						
2			10			140
4	500	250	20	50	50	130
6			30			120
8			40			110
ZnSO₄ 100 mM						
12			60			90
14	500	250	70	50	50	80
16			80			70
18			90			60

El medio se homogenizó y utilizó para los experimentos de cultivo en medio líquido.

- **Medio mínimo mineral líquido modificado con 2-8 mM de hierro**

Para preparar el medio mínimo mineral adicionado con distintas concentraciones de hierro se utilizaron las soluciones de medio MM 2X (sin solución de sales/elementos traza), leucina 10X, uracilo 10X, sulfato férrico 100 mM, solución de sales base y agua desionizada (Grado milliQ) en los volúmenes presentados en la tabla 11.

Tabla 6. Formulaciones de medio MMM líquido con 2-8 mM de hierro

Concentración final (mM)	Volumen final (ml)	MM 2X (ml)	Ura 10X (ml)	Leu 10X (ml)	Sol sales (ml)	FeSO ₄ 100 mM (ml)	H ₂ O (ml)
2						10	107.75
4	500	250	50	50	32.25	20	97.75
6						30	87.75
8						40	77.75

El medio se homogenizó y utilizó para los experimentos de cultivo en medio líquido.

- **Medio mínimo mineral modificado sin calcio, cobre, hierro o zinc.**

Para preparar 1 L de medio mínimo mineral sin cationes se utilizaron 500 mL de solución de medio MM 2X (sin solución de sales/elementos traza), 100 mL de leucina 10X, 100 mL de uracilo 10X, 237.5 mL de agua desionizada (Grado milliQ) y 62.5 mL de la solución de sales modificada sin el metal de interés.

- **Solución de sales modificada sin calcio**

Para preparar 1 L de solución de sales sin calcio se pesaron y mezclaron 16 grs de fosfato de potasio KH₂PO₄ (Jalmek CAS: 7778-77-0), 4 grs de sulfato de sodio Na₂SO₄ (J. T. Baker CAS: 7757-83-7), 8 grs de cloruro de potasio KCl (Fisher Chemicals CAS: 7447-40-7), 2 grs de sulfato de magnesio MgSO₄ (Jalmek CAS: 100034-99-8) y 8 mL de la solución de elementos traza.

- **Solución de sales/ elementos traza modificada sin cobre**

Para preparar la solución de sales modificada sin cobre se llevó a cabo la formulación base descrita con anterioridad, realizando la modificación pertinente en los elementos traza, en donde para preparar 1 L se pesaron y mezclaron 0.06 grs de ácido bórico H₃BO₃ (Armstrong Biosciences), 0.14 grs de cloruro manganoso MnCl₂*4(H₂O) (Jalmek CAS: 13446-34-9), 0.4 grs de cloruro de zinc ZnCl₂ (Jalmek CAS: 7646-85-7), 0.04 grs de molibdato de sodio Na₂MoO₄ (CTR CAT: CTR03440) y 0.1 gr de cloruro férrico FeCl₃*6(H₂O) (Jalmek CAS: 10025-77-1). Finalmente, se adicionó el agua necesaria para llegar al volumen final.

- **Solución de sales/ elementos traza modificada sin hierro**

Para preparar la solución de sales modificada sin hierro se llevó a cabo la formulación base descrita con anterioridad, realizando la modificación pertinente en los elementos traza, en donde para preparar 1 L se pesaron y mezclaron 0.06 grs de ácido bórico H_3BO_3 (Armstrong Biosciences), 0.14 grs de cloruro manganoso $MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$ (Jalmek CAS: 13446-34-9), 0.4 grs de cloruro de zinc $ZnCl_2$ (Jalmek CAS: 7646-85-7), 0.04 grs de molibdato de sodio Na_2MoO_4 (CTR CAT: CTR03440) y 0.4 grs de sulfato cúprico $CuSO_4 \cdot 5(H_2O)$ (Jalmek CAS: 7758-99-8). Finalmente, se adicionó el agua necesaria para llegar al volumen final.

- **Solución de sales/ elementos traza modificada sin zinc**

Para preparar la solución de sales modificada sin zinc se llevó a cabo la formulación base descrita con anterioridad, realizando la modificación pertinente en los elementos traza, en donde para preparar 1 L se pesaron y mezclaron 0.06 grs de ácido bórico H_3BO_3 (Armstrong Biosciences), 0.14 grs de cloruro manganoso $MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$ (Jalmek CAS: 13446-34-9), 0.04 grs de molibdato de sodio Na_2MoO_4 (CTR CAT: CTR03440), 0.1 gr de cloruro férrico $FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$ (Jalmek CAS: 10025-77-1) y 0.4 grs de sulfato cúprico $CuSO_4 \cdot 5(H_2O)$ (Jalmek CAS: 7758-99-8). Finalmente, se adicionó el agua necesaria para llegar al volumen final.

- **Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7(H_2O)$) 100 mM y 500 mM**

Para preparar la solución stock de sulfato de zinc (Jalmek CAS:7446-20-0) a una concentración de 100 mM se pesaron 1.437 g del reactivo y se aforaron a 50 ml con agua desionizada (Grado milliQ).

Para la solución stock de sulfato de zinc (Jalmek CAS:7446-20-0) a una concentración de 500 mM se pesaron 7.185 g del reactivo y se aforaron a 50 ml de agua desionizada.

- **Cloruro de calcio (CaCl_2) 4 M y 8 M**

Para preparar la solución stock de cloruro de calcio (Jalmek CAS: 10043-52-4) a una concentración de 4 M se pesaron 22.19 g del reactivo y se aforaron a 50 ml con agua desionizada.

Para preparar la solución stock de cloruro de calcio (Jalmek CAS: 10043-52-4) a una concentración de 8 M se pesaron 44.18 g del reactivo y se aforaron a 50 ml con agua desionizada.

- **Sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) 100 mM**

Para preparar la solución stock de sulfato férrico (Jalmek CAS: 15244-10-7) a una concentración de 100 mM se pesaron 1.99 g del reactivo y se disolvieron en 10 ml de agua. La solución se esterilizó por filtración con una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore REF: GSWP02500) y posteriormente se aforó a 50 ml con agua desionizada estéril.

- **Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 100 mM**

Para preparar la solución stock de sulfato cúprico (Jalmek CAS: 7758-99-8) a una concentración de 100 mM se pesaron 1.24 g del reactivo y se aforaron a 50 ml con agua desionizada.

- **Uracilo 10X (Ura)**

Para la solución stock de uracilo (Sigma CAS: 66-22-8) 10X se pesaron 22.4 mg del reactivo y se disolvieron en 50 ml de agua desionizada, se esterilizó mediante filtración con una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore REF: GSWP02500) y se le adicionaron 50 ml de agua desionizada estéril para obtener un volumen final de 100 ml.

- **Leucina 10X (Leu)**

Para la solución stock de leucina (Jalmerk CAS: 61-90-03) 10X se pesaron 262 mg del aminoácido y se disolvieron en 50 ml de agua desionizada, se esterilizó mediante filtración con una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m de diámetro de poro (Millipore REF: GSWP02500) y se le adicionaron 50 ml de agua desionizada estéril para obtener un volumen final de 100 ml.

- **Acido 5 Fluoroorótico 100X (5'FOA)**

Para la solución stock de ácido 5 fluoroorótico (GoldBio CAT: F-230) 100X se pesaron, en condiciones de esterilidad, 100 mg del reactivo y se disolvieron en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) grado biología molecular (Sigma CAS: 67-68-5).

- **Acetato de amonio 7.5 M**

Para preparar la solución de acetato de amonio (CTR CAT: CTR0140) a una concentración de 7.5 M se pesaron 5.781 g del reactivo y se aforó a 10 ml con agua desionizada.

- **Buffer de lisis TSNT**

Para preparar el buffer de lisis TSNT se pesaron 2 g de tritón X-100 (Sigma CAS: 9002-93-1) y 1 g de dodecilsulfato sódico (SDS) (Jalmek CAS: 151-21-3), se adicionaron 10 ml de NaCl 1 M, 1 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.0 y se aforó a 100 ml con agua desionizada.

- **Cloruro de sodio 1M**

Para preparar la solución stock de NaCl (Jalmek CAS: 767-14-5) 1M se pesaron 1.461 g del reactivo y se aforó a 25 ml con agua desionizada.

- **Tris-HCl 1 M pH 8.0**

Para preparar la solución stock de Tris-HCl 1 M se pesaron 12.114 g de Tris base (Promega REF: H5133) y se adicionaron 50 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 8.0 con HCl (CTR COD: 07444) y se llevó a un volumen final de 100 ml.

- **Buffer TBE 10X**

Para preparar el buffer TBE 10X se pesaron y mezclaron 10.8 g de Tris base (Promega REF: H5133) y 5.5 g de ácido bórico (Armstrong Biosciences), se aforaron a 80 ml con agua desionizada y se le adicionaron 4 ml de EDTA (Promega REF: V4231) pH 8.0, la solución se llevó a un volumen final de 100 ml.

- **Buffer acetato de litio**

Para preparar el buffer de acetato de litio se adicionaron 2 ml de Buffer TE 10X, 2 ml de la solución de acetato de litio 10X pH6 y se aforó con agua desionizada a 20 ml.

- **Buffer TE 10X**

Para preparar el buffer TE 10X se adicionaron 2 ml de la solución Tris-HCl 1M, 400 µl de EDTA 0.5 M, se llevó a un volumen final de 20 ml con agua desionizada.

- **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M**

Para preparar la solución de EDTA (Invitrogen CAT: 15576-028) a una concentración de 0.5 M se pesaron 4.306 g del reactivo y se llevaron a un volumen final de 25 ml con agua desionizada.

- **Acetato de litio 10X**

Para preparar la solución de acetato de litio (Alfa Aesar CAS: 6108-17-4) 10X se pesaron 2.04 g del reactivo y se disolvieron en 10 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 6.0 y se aforó a 20 ml.

- **PEG 3350 (Polietilenglicol 3350) 40%**

Para preparar la solución de PEG 3350 (Sigma CAS: 25322-68-3) al 40% se pesaron 2 g del reactivo y fueron llevados a un volumen final de 5 ml con el buffer de acetato de litio. La solución se preparó el día de su uso y se esterilizó mediante filtración con una

membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore REF: GSWP02500).

- **Acetato de potasio 1M pH 5.0**

Para preparar la solución de acetato de potasio (CTR CAT: CTR00272) a una concentración de 1M se pesaron 2.944 g del reactivo y se agregaron 15 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 5.0 y se aforó a 30 ml.

- **Agarosa 1%**

Para preparar agarosa (Promega REF: V3125) al 1% se pesó 1 g del reactivo y se adicionaron 10 ml del buffer TBE 10X, la solución se llevó a un volumen final de 100 ml con agua destilada y se calentó hasta que tuviera apariencia cristalina y el reactivo estuviese completamente disuelto.

- **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1670 μM pH 8.0**

Para preparar EDTA (Invitrogen CAT: 15576-028) a una concentración de 1670 μM se pesaron 0.018 g del reactivo y se agregaron 15 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 8.0 y se aforó a 30 ml.

- **Solución de lavado de membranas**

Para preparar la solución de lavado de membranas se adicionaron 1 ml de acetato de potasio 1M pH 5.0, 1 ml de EDTA 1670 μM pH 8.0, 83.33 ml de etanol al 96% y 14.67 ml de agua desionizada estéril para obtener un volumen final de 100 ml. La solución se esterilizó mediante filtración con una membrana de 0.22 μm de diámetro de poro.

- **Solución de unión a membranas**

Para preparar la solución de unión a membranas se pesaron 10.63 g de isotiocianato de guanidina (BioBasic CAS: 593-84-25) y se mezclaron con 10 ml de acetato de potasio 1M; la solución se llevó a un volumen final de 10 ml y se esterilizó mediante filtración

con una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore REF: GSWP02500).

- **Buffer fosfato salino pH 7.6 (PBS)**

Para preparar 50 mL de buffer PBS 10X se pesaron y mezclaron 3.8 g de cloruro de sodio y 0.6 g de fosfato de sodio monobásico; Después se adicionaron 40 mL de agua destilada para posteriormente ajustar el pH con hidróxido de sodio hasta llegar a 7.6, finalmente se aforó a 50 mL. El buffer fue esterilizado y preparado en una relación 1:10 con agua destilada estéril para la solución de trabajo.

- **Syto® 9**

Para preparar la solución de trabajo de Syto® 9 (Thermo Fisher Scientific Cat: S34854) se partió de la solución comercial con una concentración de 5 mM y posteriormente se mezcló 10 μl de la solución 5 mM y 90 μl de PBS 1X obteniendo una dilución 1:100.

- **Phen Green Sk Diacetato**

Para preparar la solución de trabajo de Phen green SK diacetato (Cayman chemicals Cas: 234075-45-7) se partió de la solución comercial a una concentración de 50 mM y posteriormente se mezcló 10 μl de la solución 50 mM y 90 μl de PBS 1X obteniendo una dilución 1:100.

- **Blanco de calcoflúor**

Para preparar la solución de trabajo de blanco de calcoflúor (Sigma Aldrich Cas: 18909) se partió de la solución comercial (Blanco de calcoflúor 1 g/L, azul de evans 0.5 g/L) y se mezcló con KOH 10% y buffer PBS 1X en una relación 1:1:3.

6.9 Caracterización genotípica de las cepas P01A y ΔMct .

Para la caracterización genotípica se realizó la extracción de ácidos nucleicos de las cepas P01A y ΔMct , siguiendo el protocolo descrito por Hoffman y Winston (1987). Se utilizaron células cultivadas en medio YNB líquido. A partir de estos cultivos se obtuvo el

cocentrado celular centrifugando (Eppendorf 5415D) 1.5 ml del cultivo durante 2 min a 12,000 rpm (este proceso se repitió tres veces decantando el sobrenadante en cada ronda). Todo el procedimiento posterior se llevó a cabo en hielo. Una vez obtenido el concentrado celular, se añadieron 100 ng de perlas de vidrio de 150-212 μm de diámetro (Sigma CAT: G9018) y 400 μl de buffer de lisis TSNT, se dejó reposar 5 min y se homogenizó en vortex (Genie 2 Mod: 3030a). Luego, se añadieron 400 μl de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) (BioBasic CAT: PD0419) y se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente, se realizaron 3 ciclos de vortex (Genie 2 Mod: 3030a) de 1 min, dejando reposar los tubos 1 min en hielo y después se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se añadieron 40 μl de acetato de amonio y 880 μl de etanol absoluto, las muestras se homogenizaron e incubaron durante 20 min a -20°C . Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm y el sobrenadante se decantó, se realizaron dos lavados con 500 μl de etanol al 70% centrifugando en cada uno 5 min a 12,000 rpm, el sobrenadante se desechó para dejar secar los tubos en gradilla con la tapa abierta durante 15 min. Finalmente se adicionaron 50 μl de agua desionizada estéril para resuspender los ácidos nucleicos, se mezcló en vortex y se almacenó a -20°C hasta su uso.

La calidad y pureza de las muestras se determinaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%

La genotipificación se llevó a cabo mediante una PCR punto final buscando confirmar la presencia del gen *dmct* en la cepa P01A y su ausencia en la cepa ΔDmct . Para esto se utilizaron combinaciones (tabla 8) con los oligonucleótidos descritos en la tabla 7 dirigidos hacia las regiones externas del gen *dmct* y el gen *Ura3* (Figura 9).

Tabla 7. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen *dmct* y sus variables

Oligonucleótido	Secuencia
Tmn5'	CGCTCTATCCCCTACCCTAACCCG
Tmn3'	GGAGTTACCCTACCGATCTCTCACGAG
Ura F	GCCTGCGAGCTGGTGCCGAG
Ura R	CTCGGCACCAGCTCGCAGGC

Tabla 8. Temperatura óptima, tiempo de extensión y tamaño esperado del fragmento amplificado de las combinaciones de oligonucleótidos utilizados

Combinación	Tm (°C)	Tiempo de extensión (min)	Tamaño del fragmento esperado (nt)		
			P01A	ΔDmtc	RDmct
Tmn5' – Tmn3'	64	3:30	3252	2751	3252
Tmn5' – Ura R	57	1:20	S/A	1139	S/A
Ura F – Tmn 3'	58	1:40	S/A	1634	S/A

S/A se refiere a: sin producto amplificado

Una vez estandarizadas las condiciones necesarias para la amplificación de los fragmentos de interés, se realizó la prueba de PCR punto final para todas las posibles cepas complementarias.

La reacción de PCR se realizó con los componentes enlistados en la tabla 6, la enzima utilizada fue la TopTaq™ DNA polimerasa (Qiagen CAT: 200203), el programa utilizado consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95° durante 5 minutos, para la amplificación de los fragmentos se programaron 35 ciclos en donde se utilizaron 95° durante 1 min para desnaturalizar el material genómico, para el alineamiento de los oligonucleótidos se seleccionó la temperatura óptima de éstos y se mantuvo durante 1 min y para la extensión de la síntesis se utilizaron 72° variando el tiempo de acuerdo a la longitud del fragmento amplificado según la tabla 8, finalmente se aplicó un ciclo de 72° durante 5 minutos para la extensión final.

Tabla 9. Componentes de reacción de PCR con la enzima Top Taq® DNA polimerasa

Componente	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Top Taq PCR Buffer 10X	2.5	1X
Solución Q 5X	5	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1	2 mM
dNTPs (10 mM)	0.5	0.2 mM
CoralLoad concentrado 10X	2.5	1X
Oligonucleótido Tmn5' (10 µM)	0.5	0.2 µM
Oligonucleótido Tmn 3' (10 µM)	0.5	0.2 µM
TopTaq DNA polimerasa (5 U/µl)	0.125	1.25 U/rx
H ₂ O libre de nucleasas	11.37	-
DNA	1	<500 ng
Volumen final	25	

6.10 Generación de la cepa complementaria

Para obtener la cepa complementaria o retromutante se llevó a cabo una primera ronda de PCR punto final (Termociclador BioRad T100) buscando obtener el fragmento correspondiente al gen *dmct*. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos Tmn5' y Tmn3', presentados en la tabla 7, situados en las zonas adyacentes al gen.

Una vez estandarizadas las condiciones necesarias para la amplificación del fragmento de interés, se procedió a realizar la amplificación en mayor volumen, realizando cuatro reacciones de 25 µl cada una. La enzima utilizada fue la Platinum™ Taq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific CAT: 10966-018), al ser una enzima de alta fidelidad, se buscaba que el fragmento amplificado tuviera la menor cantidad de errores en la secuencia, evitando así la alteración funcional del gen a reestablecer.

La reacción de PCR se realizó con los componentes enlistados en la tabla 10, el programa utilizado consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95° durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°, 62° y 68° durante 1, 1 y 3 minutos para desnaturalización, alineamiento y extensión respectivamente, por último, un ciclo de 68° durante 5 minutos para la extensión final.

Tabla 10. Protocolo de componentes de reacción de PCR con la enzima Platinum™ Taq DNA polimerasa

Componente	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Buffer de alta fidelidad 10X	2.5	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1	2 mM
dNTPs (10 mM)	0.5	0.2 mM
Oligonucleótido Tmn5' (10 µM)	0.5	0.2 µM
Oligonucleótido Tmn 3' (10 µM)	0.5	0.2 µM
Platinum® Taq DNA polimerasa (5 U/µl)	0.1	1 U/rx
H ₂ O libre de nucleasas	18.9	-
DNA	1	<500 ng
Volumen final	25	

6.11 Purificación y cuantificación de material genómico

Para purificar el fragmento amplificado del gen *dmct* con sus regiones adyacentes, se procedió a correr el producto de PCR obtenido mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Pronadisa CAT: 8100.25) aplicando una corriente eléctrica de 90 Voltios

durante 30 min. Una vez identificada la banda de interés (3252 pb), el pedazo de agarosa que contenía dicha banda se cortó y depositó en un tubo de 1.7 ml estéril. Se adicionaron 10 μ l de solución de unión a membrana por cada 10 mg de gel y se incubó a 65°C en una placa de calentamiento (Eppendorf Thermomixer R) hasta que el gel se fundió y se homogenizó con la solución. La mezcla se depositó en una columna de purificación de DNA ensamblada en un tubo de colecta y se dejó incubar a TA por 1 min, después se centrifugó 12,000 rpm (Eppendorf 5415D) durante 1 min. Se deshechó el sobrenadante y se reensambló la columna en el tubo de colecta. Se adicionaron 700 μ l de solución de lavado de membrana y nuevamente se centrifugó 12,000 rpm durante 1 min, repitiendo este paso 2 veces. Finalmente, la columna de purificación se transfirió a un tubo de 1.7 ml nuevo, estéril y se adicionaron 50 μ l de agua libre de nucleasas en la columna, se incubó durante 1 min a TA y se centrifugó 12,000 rpm durante 1 min. Finalmente, la calidad e integridad del producto purificado se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La cuantificación del fragmento purificado se llevó a cabo por espectrofotometría en el Nanodrop (Thermo Scientific 2000) tomando en cuenta la concentración (ng/ μ l) y pureza (relación 260/280, 260/230) del mismo para futuros procedimientos.

6.12 Generación de células litio-competentes *Y. lipolytica*

Para la generación de las células litio competentes se siguió el protocolo descrito por Davidow y col. (1985). Brevemente, se utilizó el pre-inóculo obtenido a partir de una colonia de la cepa Δ Dmct sembrada en 15 ml de medio YPD, se incubó (Incubadora BioBase BJPV 103B) a 28°C durante toda la noche (12-14 h) con agitación (200 rpm). Para el inóculo se tomaron 100 μ l del pre-inóculo y se inocularon en 50 ml de medio YPD, incubando en las condiciones antes descritas o hasta que se alcanzó la absorbancia (O.D. 600 nm) de 1-2 unidades. Una vez obtenida la densidad celular necesaria, las células fueron transferidas a tubos cónicos de 50 ml y centrifugadas 5 min a 3,500 rpm; se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados del concentrado celular con 5 ml de buffer TE pH 7.5, el paquete celular se resuspendió en 1.5 ml de buffer de acetato de litio 1X a pH 6. Las células se incubaron durante 1 h a 28°C con agitación (70 rpm).

6.13 Transformación por la técnica de choque térmico de *Y. lipolytica*

Para el proceso de transformación se siguió el protocolo descrito por Davidow y col. (1985). Brevemente, 100 µl de células litio competentes se transfirieron a tubos de polipropileno de 1.7 ml enfriados previamente en hielo, se agregó el DNA correspondiente al gen *dmct* purificado (~500-1000 ng) y 5 µl (10 mg/µl) de DNA de esperma de salmón previamente desnaturalizado durante 5 min a 95°C. Posteriormente todos los componentes se mezclaron suavemente con la micropipeta y se incubó durante 30 min a 28°C sin agitación. Después se agregaron 700 µl de PEG 40% para incubar nuevamente durante 1 h a 28°C con agitación (70 rpm).

Para llevar cabo el choque térmico, las células se incubaron 10 min a 39°C e inmediatamente se colocaron 15 min en hielo. Se adicionaron 800 µl de buffer TE pH 7.5 y el paquete celular se obtuvo por centrifugación (2 min, 4,000 rpm), posteriormente, el paquete celular se resuspendió en 230 µl de buffer TE pH 7.5.

Las células transformadas fueron sembradas por extensión en superficie en placas Petri de 90 x 15 mm con medio YNB adicionado con leucina, uracilo y 5'FOA. Las placas inoculadas se incubaron durante 36 horas a 25°C.

6.14 Selección de células complementarias

Una vez que se obtuvieron las colonias en medio selectivo, estas fueron resembradas en las condiciones descritas, usando el mismo medio para su reproducción. Posteriormente, las colonias fueron inoculadas en tubos cónicos de 50 ml que contenían 5 ml de medio YNB líquido adicionado con leucina, uracilo y 5'FOA, se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm) durante 24 h y se procedió a su caracterización genotípica para comprobar la inserción del gen nativo en el genoma de las células transformantes.

6.15 Caracterización molecular de las cepas

La comprobación de la inserción del gen nativo en la posición correcta en el genoma de las células y la sustitución del gen marcador *Ura 3* se realizó por dos técnicas diferentes:

PCR punto final y por digestión enzimática del DNA correspondiente al locus manipulado.

A partir del cultivo líquido de las posibles cepas complementarias se procedió a realizar la extracción de DNA genómico y la reacción de PCR con los oligonucleótidos diseñados para la caracterización primaria de las cepas p01A y $\Delta Dmct$ (Ver apartado 6.9).

Para confirmar la presencia del gen nativo en las células transformadas, se llevó a cabo una digestión enzimática del locus correspondiente a la región manipulada (obtenido por PCR) utilizando las enzimas de restricción EcoRI, XhoI y SacI. Para esto se realizó previamente la amplificación del gen *dmct* de las cepas P01A, $\Delta Dmct$ y las posibles complementarias con los oligonucleótidos Tmn5' y Tmn3', el producto de la PCR se reveló mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se purificó (Apartado 6.11). El producto obtenido se cuantificó en el NanoDrop.

Para la digestión enzimática se utilizaron las enzimas EcoRI (Promega 10U/ μ l), XhoI (Thermo Scientific 10U/ μ l) y SacI (Thermo Scientific 10U/ μ l), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El uso de estas enzimas se decidió en base a que en el análisis *in silico* (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) de la acción de estas enzimas se determinó un bandeo diferencial entre la cepa P01A (que acarrea el gen *dmct* integro) y la cepa mutante ΔDmc (que carece del gen *dmct* y en su lugar se encuentra el gen marcador *Ura3*) como se muestra en la figura 10.

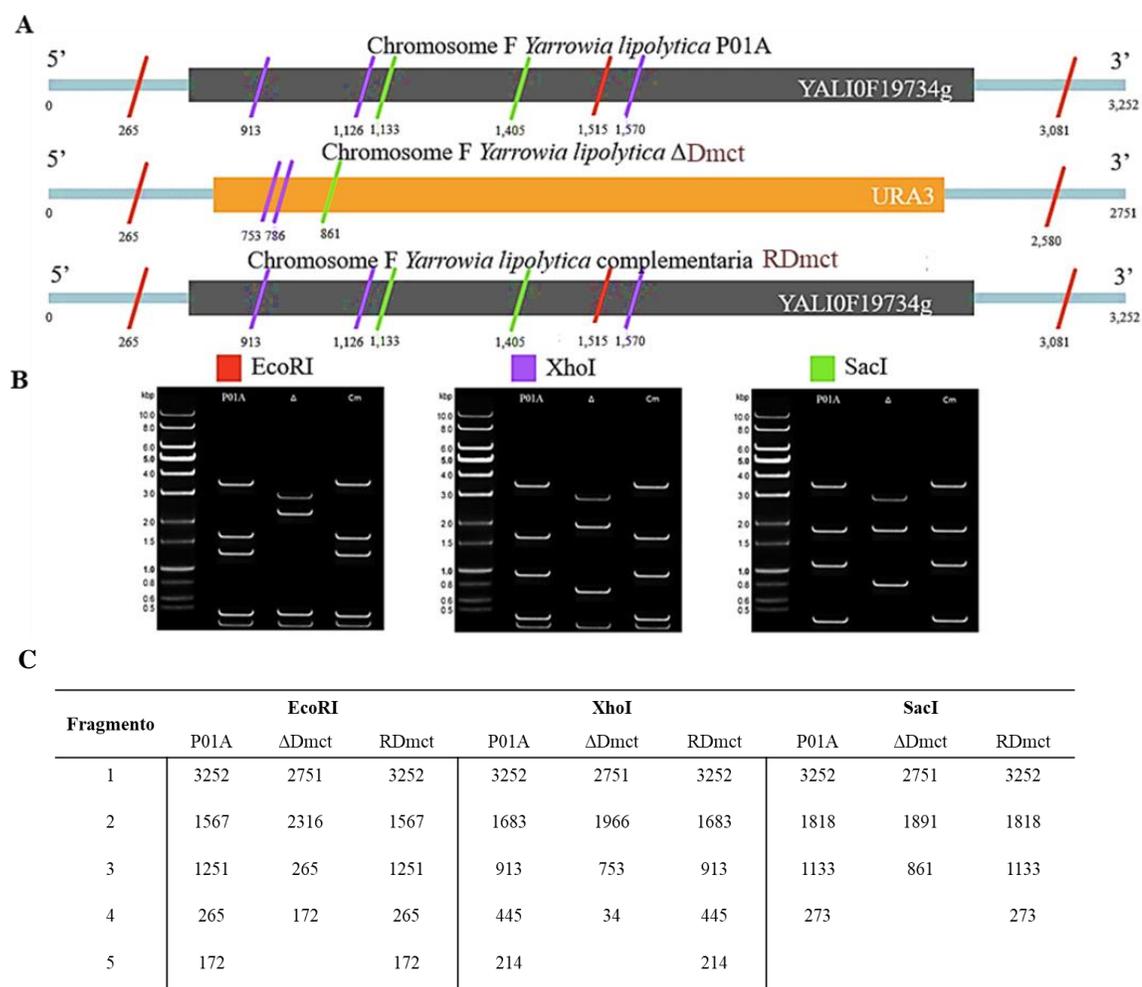


Figura 9. Tamaño del bandeo esperado con la digestión enzimática de las variantes del gen *dmct* con las enzimas EcoRI, XhoI y SacI. **A.** Patrón de restricción teórico **B.** Simulación práctica del patrón de restricción. **C.** Tamaño de los fragmentos esperados, como productos de la digestión enzimática

Las condiciones utilizadas para la digestión con cada una de las enzimas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 11. Condiciones utilizadas para la restricción enzimática

Nombre	EcoRI	XhoI	SacI
Buffer Universal 10X	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Purificado DNA	~500 ng	~500 ng	~500 ng
Enzima (10U/ μ l)	0.5	2 μ l	2 μ l
H ₂ O*	CBP 20 μ l	CBP 20 μ l	CBP 20 μ l
Volumen final	20 μ l	20 μ l	20 μ l
Incubación/tiempo	37°C/3 h	37°C/3 h	37°C/3 h
Inactivación	65°C/20 min	80°C/20 min	65°C/20 min

ETAPA 3

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS

6.16 Análisis cualitativo del crecimiento celular de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct en presencia de cationes

Para determinar los cambios en el fenotipo de las tres cepas se realizó la comparación del crecimiento de éstas en medios de cultivo tanto sólidos como líquidos, formulados con diferentes concentraciones de cationes divalentes. Se partió de un pre-inóculo generado por una colonia de cada cepa (P01A, Δ Dmct, RDmct016, RDmct017 y RDmct021) cultivadas en 15 ml de medio YNB líquido, el cultivo se incubó toda la noche a 28°C con agitación (200 rpm), se lavaron dos veces con agua desionizada estéril y se ajustó la densidad óptica del cultivo a 1 unidad, posteriormente se realizaron cinco diluciones en serie (1:10). Las diluciones se inocularon por la técnica de estampado de gota en placas Petri de 90 x 15 mm que contenían medio YNB adicionado con diferentes concentraciones de Ca^+ (800 a 900 mM con incrementos de 25 mM), Cu^+ (2 a 4 mM con incrementos de 0.5 mM), Fe^+ (6 a 8 mM con incrementos de 0.5 mM) y Zn^+ (16 a 20 mM con incrementos de 1 mM). Como referencia para la comparación del crecimiento se utilizó el medio YNB base. Una vez sembradas las placas, se incubaron a 28°C por 72 h.

Además de evaluar el crecimiento celular en cada una de las condiciones descritas se determinó la morfología macroscópica de las colonias de las cepas parental (P01A) y mutante (Δ Dmct) con base en parámetros como margen, elevación, color, consistencia, etc. y microscópicamente, mediante la observación de éstas en microscopía de campo claro con el fin de identificar posibles cambios entre estas.

6.17 Análisis cuantitativo del crecimiento celular de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct en presencia o ausencia de cationes

Para determinar los patrones de crecimiento de las diferentes cepas en ausencia de cationes divalentes y crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de cationes divalentes se partió de un pre-inóculo generado por una colonia de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct016 cultivadas en 15 ml de medio YNB líquido, el cultivo se incubó toda la noche

a 28°C con agitación (200 rpm). 1 ml del cultivo anterior se inoculó en un matraz de 500 mL que contenían 150 ml de medio YNB líquido, se incubó toda la noche (28°C, 200 rpm). Las células se lavaron dos veces con agua desionizada y se resuspendieron en 30 ml de agua desionizada estéril para ser inoculadas utilizadas en los experimentos posteriores.

Crecimiento en ausencia de cationes divalentes

Para la caracterización de las tres cepas ante el efecto de la ausencia de cationes divalentes se llevaron a cabo dos etapas experimentales.

En la primer etapa, las cepas se inocularon en matraces de 250 mL que contenían 50 ml de $MMCa^+$, $MMCu^+$, $MMFe^+$ y $MMZn^+$ utilizando como control el medio mínimo mineral base (MM). Los cultivos se mantuvieron a 28°C durante 20 h con agitación (200 rpm).

En la segunda etapa, para eliminar las reservas de nutrientes en la célula y evitar que el crecimiento observado se debiese a tales almacenamientos adquiridos durante la incubación del pre-inoculo, los cultivos celulares de las tres cepas se centrifugaron (4000 rpm) y lavaron dos veces, el concentrado celular se resuspendió en 50 ml de agua desionizada estéril y se incubaron 4 horas a 28°C con agitación (200 rpm). Posteriormente las células se lavaron de nuevo y se inocularon de la misma forma que el experimento anterior.

Crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de cationes divalentes

Las células cultivadas en medio YNB se inocularon en matraces de 250 mL que contenían 50 ml de medio YNB adicionado con diferentes concentraciones de cada uno de los siguientes cationes: Calcio (650-800 mM), Cobre (2-8 mM), Hierro (MMM 2-8 mM) y Zinc (12-18 mM); se utilizó como control el medio YNB base. Los cultivos se incubaron 20 h a 28°C con agitación (200 rpm).

6.18 Comparación de la acumulación intracelular de cationes metálicos divalentes de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct mediante microscopia de fluorescencia

Para evaluar las diferencias en la acumulación intracelular de iones se realizaron ensayos de fluorescencia, tomando 2 ml de la mejor condición de cada tratamiento de los cultivos de medio líquido, las células fueron lavadas con buffer PBS 1X dos veces y resuspendidas en 500 μ l de buffer PBS 1X para posteriormente ser procesadas según el protocolo seleccionado.

Para la tinción de ácidos nucleicos se utilizaron 20 μ l de células previamente lavadas con buffer PBS y se adicionaron 5 μ l de la solución de trabajo de Syto9, las células se incubaron 10 min en oscuridad y se lavaron dos veces con buffer PBS, se resuspendieron en 20 μ l y se montaron para microscopía. El microscopio de fluorescencia (Leica M600) se ajustó al rango de absorción/emisión 485/498 nm.

Para la tinción de cationes divalentes se utilizaron 20 μ l de células previamente lavadas con buffer PBS y se adicionaron 5 μ l de la solución de trabajo de Phen green SK, las células fueron incubadas 1 hora en oscuridad para ser lavadas dos veces con buffer PBS, las células se resuspendieron en 20 μ l y se montaron para microscopía. El microscopio de fluorescencia se ajustó al rango de absorción/emisión 507/532 nm.

La tinción de pared celular se llevó a cabo tomando 10 μ l de células previamente lavadas con buffer PBS y se montaron en el portaobjetos, se adiciono 1 μ l de la solución de trabajo de blanco de calcoflúor y se homogenizó, se colocó el cubreobjetos y se observaron al microscopio. El microscopio de fluorescencia se ajustó al rango de absorción/emisión 360/430 nm.

Todas las imágenes fueron obtenidas y procesadas mediante el software Leica Application Suite (LAS) V4.0.

6.19 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con el paquete estadístico SPSS v20; se obtuvieron los promedios, error estándar y los datos estadístico-descriptivos de los diferentes procesos analizados. Para la comparación de los resultados se utilizó la prueba estadística ANOVA en donde los valores de $p < 0.5$ se consideraron estadísticamente significativos.

VII. RESULTADOS

ETAPA 1

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

7.1 Análisis de similitud

Para visualizar las regiones específicas de similitud entre la proteína codificada por el gen *dmct* y sus posibles homólogas, se realizó primero el alineamiento múltiple del dominio CDF (Figura 10) y de la proteína completa (Figura 11).

Los resultados del alineamiento múltiple del dominio CDF se observa un alto grado de conservación en los residuos aminoacídicos entre las posibles proteínas homólogas, sin embargo, la proteína codificada por el gen *dmct* no mantiene tal conservación.

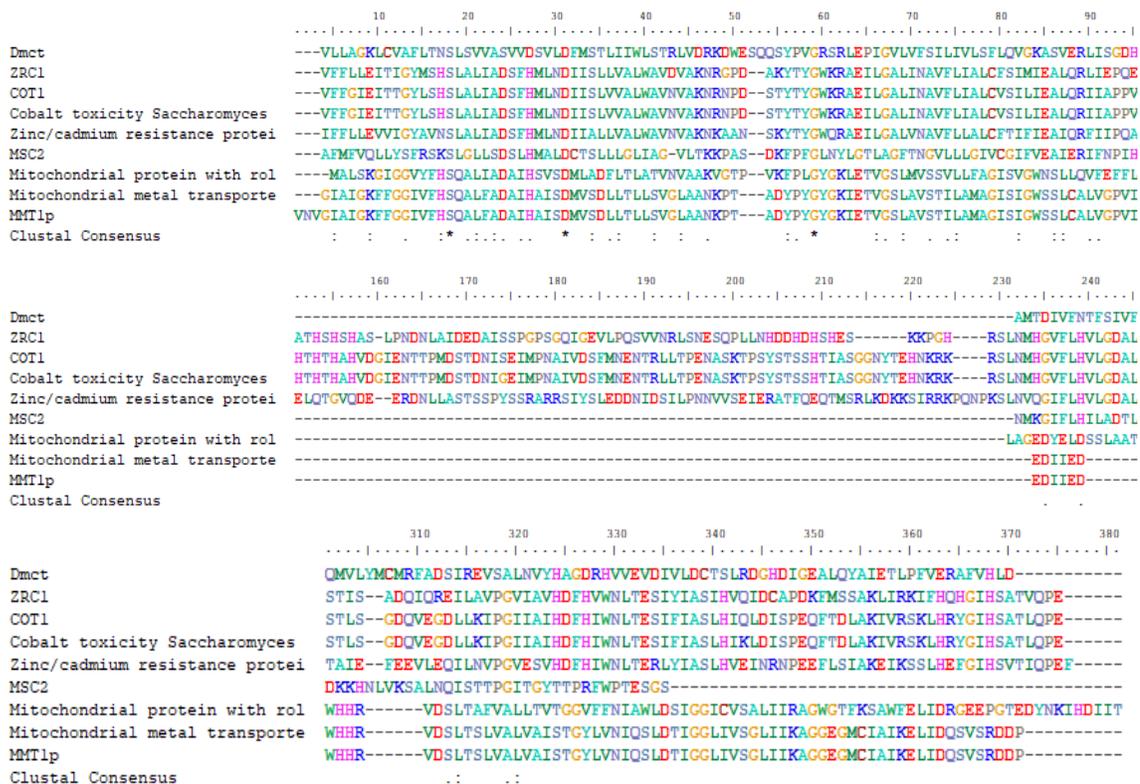


Figura 10. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de la región correspondiente al dominio CDF de las proteínas homólogas al gen *dmct* presentes en diferentes especies. La figura se obtenido mediante el programa BioEdit por el algoritmo ClustalW.

Por otro lado, en la comparación de la secuencia aminoacídica completa de las proteínas posibles homologas, se agrupan principalmente dos grupos de éstas, así como se resaltan las zonas ricas en histidina (rosa) características de los transportadores CDF, sin embargo, no se observó que la proteína codificada por el gen *dmct* compartiera dichas características o se agrupara con otras proteínas.

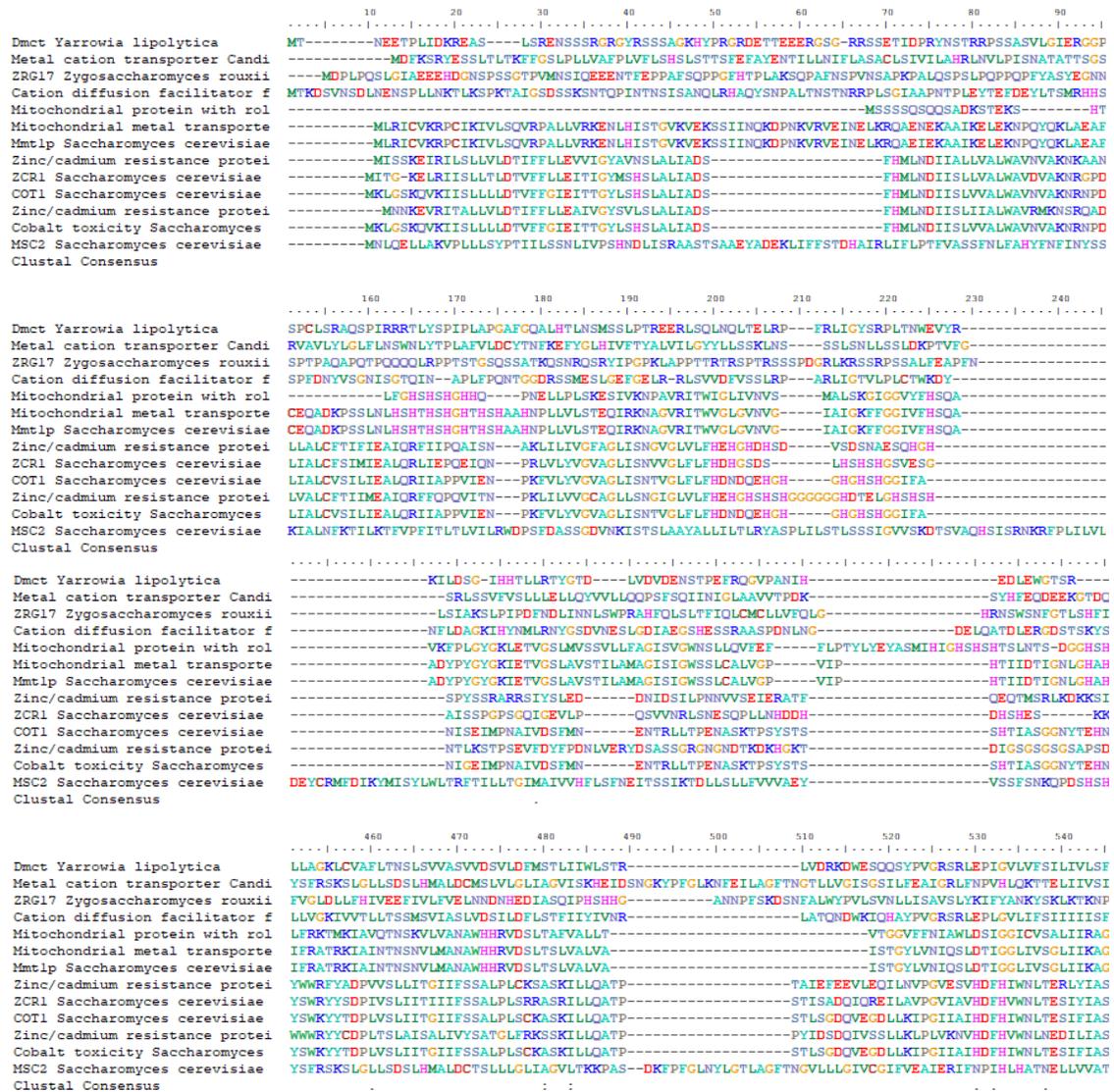


Figura 11. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las proteínas homologas al gen *dmct* presentes en diferentes especies. La figura se obtuvo mediante el programa BioEdit por el algoritmo ClustalW.

7.2 Comparación con proteínas similares

Se determinó la localización subcelular con base a la composición de la secuencia proteica y sus motivos funcionales (Figura 10 y 11), pasando estos datos a una matriz numérica en donde se compara la proteína problema mediante la clasificación del vecino más cercano con todas las proteínas dadas de alta en las bases de datos, prediciendo así aquellas con las que comparte ubicación. En la Tabla 12 se observan los resultados obtenidos enlistando los genes que codifican a proteínas que, según la matriz antes mencionada, se ubican correlacionados al gen *dmct*, las proteínas codificadas por estos genes pertenecen a levaduras, cuentan con un porcentaje de identidad del 11 al 14% y se encuentran localizadas en su mayoría en membrana plasmática, aunque también se reportan algunas en organelos como vacuola, aparato de Golgi y retículo endoplasmático (Tabla completa en anexos).

Tabla 12. Localización subcelular de proteínas homólogas a Dmct de *Y. lipolytica* en otras especies.

Gen	Proteína	Organismo	%ID	Localización
<i>dnf2</i>	ATPasa transportadora de fosfolípidos Dnf2	<i>S. cerevisiae</i>	11	Membrana plasmática
<i>fet4</i>	Proteína de transporte de baja afinidad Fe (2+)	<i>S. cerevisiae</i>	12	Membrana plasmática
<i>pma2</i>	ATPasa 2 de membrana plasmática	<i>S. cerevisiae</i>	13	Membrana plasmática
<i>pmc1</i>	ATPasa transportadora de calcio 2	<i>S. cerevisiae</i>	12	Vacuola
<i>pma1</i>	ATPasa de membrana plasmática	<i>K. lactis</i>	14	Membrana plasmática
<i>pmr1</i>	ATPasa 1 transporte de calcio	<i>Y. lipolytica</i>	14	Aparato de Golgi
<i>pma1</i>	ATPasa 1 de membrana plasmática	<i>S. pombe</i>	13	Membrana plasmática
<i>sul2</i>	Sulfato permeasa 2	<i>S. cerevisiae</i>	12	Membrana plasmática
<i>ena5</i>	Transporte de sodio ATPasa 5	<i>S. cerevisiae</i>	14	Membrana plasmática
<i>ena2</i>	Transporte de sodio ATPasa 2	<i>S. cerevisiae</i>	14	Membrana plasmática
<i>chs2</i>	Quitina sintasa 2	<i>P. brasiliensis</i>	13	Membrana plasmática
<i>pma2</i>	ATPasa 2 de membrana plasmática	<i>S. pombe</i>	14	Membrana plasmática
<i>pmt1</i>	Dolililfosfato-manosa - proteína manosiltransferasa 1	<i>S. cerevisiae</i>	13	Retículo endoplasmático

Los datos se obtuvieron a partir de su secuencia aminoacídica utilizando el software WoLF PSORT.

Adicionalmente, se utilizaron las proteínas codificadas por genes posibles homólogos ortólogos a *dmct* de *Y. lipolytica* y se realizó una comparación entre la secuencia de la proteína codificada por *dmct* completa contra las demás proteínas; se comparó también la región correspondiente al dominio funcional CDF, obteniendo así el porcentaje de similitud entre secuencias que va del 19.01% al 44.3% de similitud en las secuencias correspondientes a la proteína completa y 19.4% al 56.77% de similitud en el dominio funcional CDF, siendo en ambas comparativas la proteína transportadora facilitadora de difusión de cationes de *C. albicans* la más similar a la proteína codificada por *dmct*.

Tabla 13. Comparación de la secuencia de los posibles homólogos ortólogos a la proteína codificada por *dmct* de *Y. lipolytica*. Los datos fueron obtenidos a partir de alineamientos locales en par.

Proteína	Función	Organismo	Numero de aminoácidos	% Similitud Secuencia	% Similitud Dominio CDF
Dmct	Posible transporte de cationes divalentes metálicos	<i>Yarrowia lipolytica</i>	555 aa	-	-
COT1	Transporta cationes metálicos en vacuola, resistencia a cobalto y rodio, respuesta a estrés.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	439 aa	22.67	18.67
ZCR1	Resistencia a zinc y cadmio	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	442 aa	21.07	19.41
Mmt1p	Transporte de zinc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	510 aa	19.28	23.44
Zrg17	Transporte de zinc en retículo endoplasmático	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	634 aa	21.14	24.24
MSC2	Homeostasis del zinc, influjo de zinc al retículo endoplásmico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	725 aa	19.12	19.88
Proteína mitocondrial de transporte de metales	Acumulación de hierro en mitocondria	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	510 aa	19.85	23.44
Proteína de respuesta a estrés por toxicidad de cobalto	Transporte vacuolar de zinc. Resistencia a cobalto y rodio.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	439 aa	19.01	18.67
Proteína transportadora facilitadora de difusión de cationes	Transporte de hierro, cobre, zinc y cadmio	<i>Candida albicans</i>	616 aa	44.30	56.77
Proteína Transportadora de cationes metálicos	Eflujo de iones de cobre, zinc y cadmio	<i>Candida albicans</i>	626 aa	20.73	20.56
Proteína de resistencia a zinc y cadmio	Eflujo de cobre, zinc y cadmio	<i>Lodderomyces elongisporis</i>	474 aa	23.20	20.70
Proteína mitocondrial relacionada a ala acumulación de hierro	Acumulación de hierro	<i>Schefferomyces stipitis</i>	430 aa	21.73	22.73
Proteína de resistencia a zinc y cadmio	Eflujo de cobre, zinc y cadmio	<i>Komagataella phaffii</i>	459 aa	19.93	19.76

La comparación del dominio CDF estuvo compuesto por secuencias de 266 aminoácidos aproximadamente.

7.3 Búsqueda y análisis de dominios funcionales

La predicción topológica de las hélices transmembranales se describe en la tabla 14 y se observan los mismos datos de manera gráfica en la figura 12, los resultados de la tabla describen una proteína de 555 aminoácidos con cinco posibles dominios transmembranales, sin embargo, en la figura, se observa un dominio transmembranal adicional al cual, técnicamente se le llama dominio débil, es decir, que no logra traspasar la membrana de lado a lado. En general, de los 555 aminoácidos de la proteína, 115.91 están contenidos dentro de la membrana y existe a 82% de probabilidad de que el extremo N-terminal se oriente hacia la región citoplasmática

Tabla 14. Predicción de los dominios transmembranales (DTM) de la proteína codificada por el gen *dmct*

Resultados TMHMM	
Longitud de la secuencia	555 aa
Numero de DTM previstos	5
Aminoácidos contenidos en DTM	115.91
DTM en primeros 60 aa	0
Posibilidad N-terminal hacia citoplasma	82%

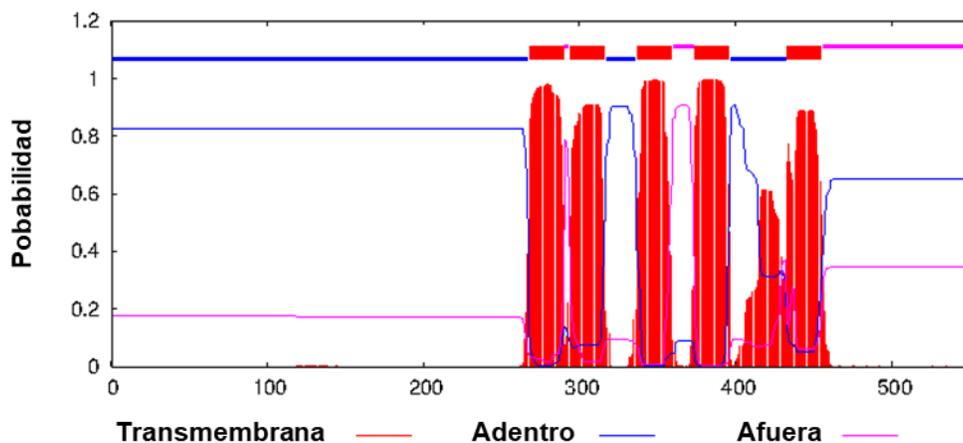


Figura 12. Disposición de los dominios transmembranales de la proteína Dmct. Los datos fueron obtenidos a partir de la secuencia aminoacídica mediante el software TMHMM V 2.0. Adentro/Afuera se refiere a la orientación hacia la región citoplasmática y al exterior de la célula respectivamente.

7.4 Estructura tridimensional

Utilizando los datos obtenidos se generó un modelo hipotético que representa la estructura tridimensional de la proteína Dmct y su localización transmembranal (Figura 13), se definen los 5 dominios transmembranales fuertes y un dominio débil, así como ambos extremos terminales orientados hacia la región citoplasmática.

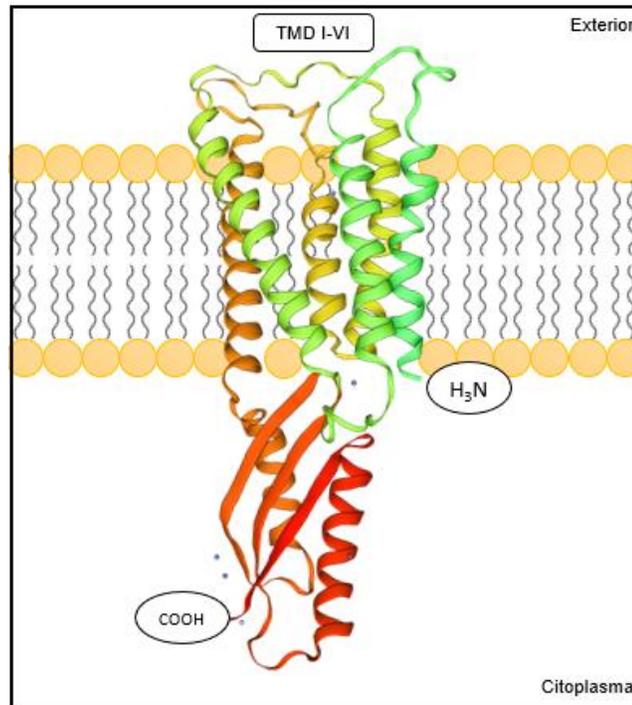


Figura 13. Propuesta topológica de la proteína Dmct. La figura se generó a partir de la predicción estructural de la proteína Dmct obtenida mediante el software SWISS-MODEL

Por otro lado, se realizó una comparación estructural entre la proteína codificada por el gen *dmct* y la proteína *cot1* de *S. cerevisiae*. Se determinó que la estructura tridimensional predicha para ambas proteínas es similar, independientemente de las diferencias que presentan en la secuencia aminoacídica.

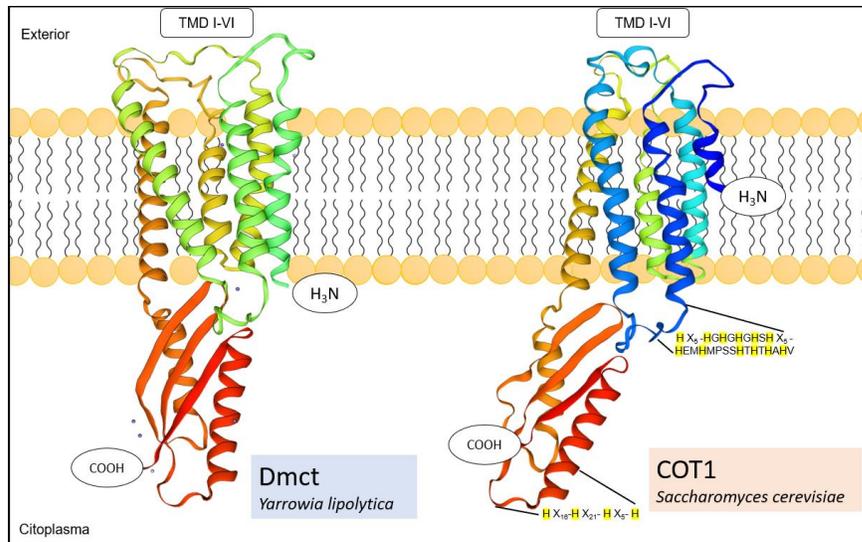


Figura 14. Comparación de la proteína codificada por el gen *dmct* contra la proteína *cot1* de *S. cerevisiae*. Generada a partir de la predicción estructural obtenida mediante el software SWISS-MODEL

7.5 Análisis filogenético y predicción de proteínas ortólogas

Los resultados del filoma muestran que el gen *dmct* de *Y. lipolytica* se ubica cercano a diversas levaduras destacando los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Cyberlindnera* y *Kuraishia*. Entre los datos a resaltar está un posible evento de duplicación presente en *B. adenivorans* originado a partir de *Y. lipolytica*, también se observa una prevalencia evolutiva causada por eventos de especiación en donde el ancestro común más lejano y posible origen del gen es *C. parapsilosis* (Figura 13).

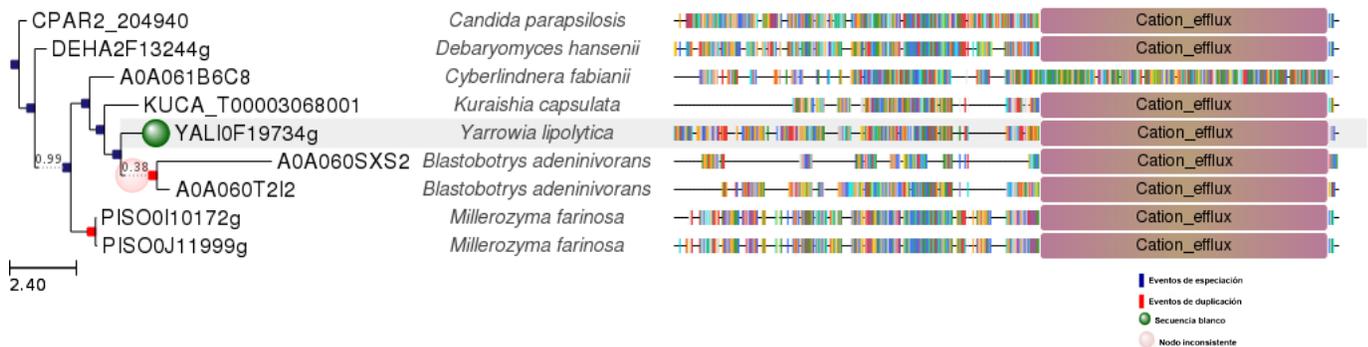


Figura 15. Filoma del gen *dmct* de *Y. lipolytica*. La figura se generó a través de su secuencia aminoacídica mediante el software Phylome DB.

7.6 Análisis de región reguladora

El análisis de la secuencia correspondiente a la región reguladora (1000 nt antes del sitio de inicio del ORF) permitió identificar 146 sitios de posible unión de 42 factores de transcripción distintos (Tabla completa en anexos) entre los que se destacan aquellos relacionados con la respuesta a estrés oxidativo (Crz1y Msn2), alta concentración de metales (Aft2p, Cup2p, Stb4p y Yap1p), biogénesis de aminoácidos (Cha4 y Gcn4), dedos de zinc (Adr1, Arg81, Ash1p, Hap y Yrr1p) y respuesta a pH (Nrg1, Haa1p y Rim101). Para los intereses de este trabajo se resaltaron los factores que se observan en la figura 17 debido a que son los responsables de la respuesta a pH o a la activación de otros genes involucrados en el transporte de metales.

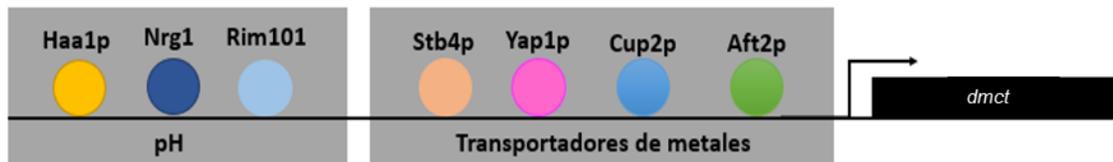


Figura 16. Posibles sitios de unión de reguladores transcripcionales del gen *dmct*. Los factores de transcripción fueron identificados mediante el software Yeastract basados en su homología con los de *S. cerevisiae*.

ETAPA 2

ANÁLISIS GENOTÍPICO DE LAS CEPAS

7.7 Generación de la cepa complementaria “RDmct”

Amplificación del gen *dmct*

Para la generación de la cepa complementaria, el primer paso fué realizar la síntesis del material genómico que funcionaría como casete de restauración del gen *dmct*. Para esto, se realizó una amplificación por PCR de la secuencia correspondiente al gen *dmct* y sus regiones adyacentes 5' y 3', utilizando como templado DNA genómico (DNAg) de la cepa P01A de *Y. lipolytica*. El producto de PCR se purificó y cuantificó asegurando su integridad y pureza mediante su análisis por electroforesis en geles de agarosa.

En la Figura 17, se observa el fragmento de 3252 nt correspondiente al gen *dmct* con sus regiones promotoras y terminadoras (Dmct-P01A), se muestra también el producto de PCR purificado a partir de geles de agarosa (Dmct-Pur1-2).

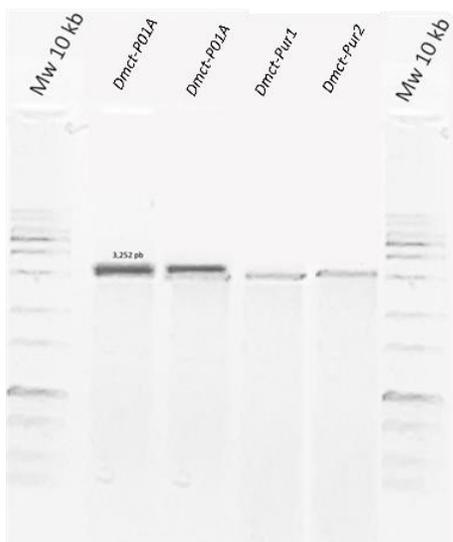


Figura 17. Producto de PCR correspondiente al gen *dmct* de la cepa P01A. El producto (3252 nt) purificado a partir de geles de agarosa se muestra en los carriles 4 y 5. En los carriles 1 y 6 se muestra el marcador de peso molecular.

Transformación y selección de posibles clonas RDmct

Para la transformación se utilizaron células litio-competentes de la cepa mutante Δ Dmct de *Y. lipolytica*, este método fue seleccionado debido a que se ha reportado con una alta eficiencia de transformación en donde el acetato de litio predispone a la membrana celular para el ingreso de material exógeno que es impulsado por el proceso de choque térmico, permitiendo que el material génico ingrese a la célula y mediante recombinación homóloga restaure el gen que previamente había sido interrumpido con el gen marcador *Ura3* (Davidow *et al.* 1985).

Posterior al ciclo de transformación, las células se sembraron por extensión en superficie en placas Petri que contenían medio YPD suplementado con ácido 5'Fluoroorotico. Cuando en el genoma está presente el gen *Ura3* que codifica a la enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilasa, el 5'FOA sufre una descarboxilación pasando de ácido 5'Fluoroorotico a ácido 5'Fluorouracilo, un metabolito citotóxico, afectando así la viabilidad de la célula. Solo aquellas células que no contengan en su genoma el gen *Ura3* son las que pueden crecer en presencia de este agente de selección (Boeke *et al.* 1987).

Las colonias que mostraron crecimiento se consideraron como posibles clonas que perdieron la construcción genética (cassette) correspondiente al genotipo mutante, eliminando el gen marcador *Ura3* del marco de lectura abierto y sustituyéndolo por el gen *dmct*, estas clonas fueron transferidas a placas con medio YNB suplementado con leucina, uracilo y 5'FOA para su identificación y posterior análisis confirmatorio.

Confirmación microbiológica de las posibles cepas RDmct

Una vez que se obtuvieron las colonias aisladas de las posibles cepas restromutantes, se procedió a su validación microbiológica utilizando los medios de cultivo descritos anteriormente; se descartaron todas aquellas clonas que no crecieron en el medio selectivo. En la figura 18 se muestra el crecimiento de las tres cepas (P01A, Δ Dcmt y la retromutante).

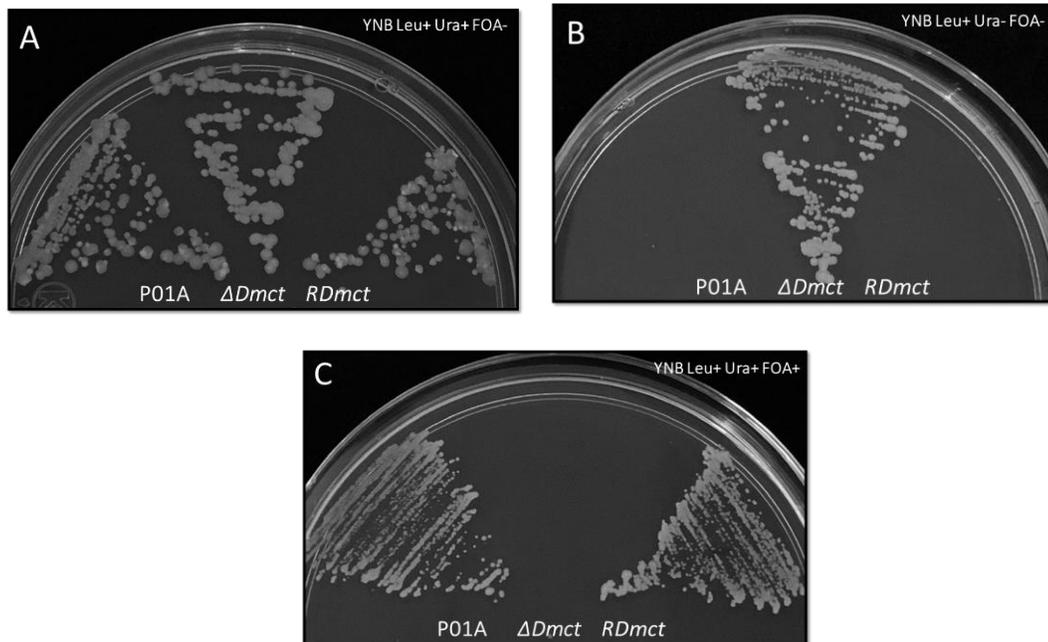


Figura 18. Crecimiento confirmatorio de las tres cepas de *Y. lipolytica* en medio YNB. **A.** Crecimiento en medio YNB suplementado con leucina y uracilo. **B.** Crecimiento en medio YNB suplementado con leucina. **C.** Crecimiento en medio YNB suplementado con leucina, uracilo y ácido 5' fluoroorótico.

En la figura 19 se muestra la comparación de la morfología de las cepas P01A, $\Delta Dmct$ y retromutante (RDmct), cultivadas en medio YNB líquido suplementado con leucina y uracilo, durante 20 horas a 28°C. Se puede observar una clara similitud en la morfología de las células correspondientes a la cepa parental P01A y la cepa retromutante (RDmct), mientras que la morfología de las células de la cepa mutante ($\Delta Dmct$) es diferente.

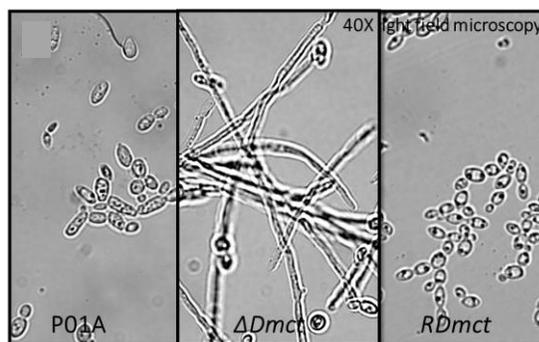


Figura 19. Crecimiento celular microscópico de las tres cepas en medio YNB suplementado con leucina y uracilo.

7.8 Caracterización genotípica de las cepas P01A, Δ Dmct Y RDmct

Confirmación del genotipo mediante PCR

La primera parte de la confirmación molecular se llevó a cabo mediante el uso de tres diferentes combinaciones de oligonucleótidos dirigidos a tres distintas. En la primera ronda se amplificó el gen *dmct* completo, en la segunda ronda se amplificó el gen *Ura3* hacia el extremo del terminador y en la tercera ronda se amplificó la región promotora hacia el gen *Ura3* (Figura 20), esperando que, en estas últimas dos rondas, la cepa P01A y la cepa complementaria no mostraran producto amplificado debido a la ausencia del gen *Ura3*.

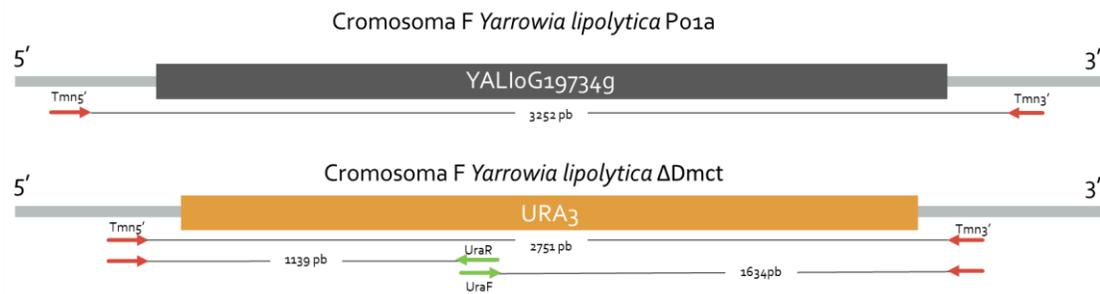


Figura 20. Esquema de las regiones reconocidas por los oligonucleótidos para la amplificación del gen *dmct* y sus regiones adyacentes (región promotora y terminadora).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21 en donde la primera ronda de PCR muestra la amplificación del gen *Dmct* presentando una banda de 3252 nt para las cepas P01A y RDmct y 2751 nt para la cepa mutante Δ Dmct. En el producto de la segunda y tercera ronda de PCR se esperaba un producto amplificado de 1634 y 1139 nt respectivamente para solo la cepa Δ Dmct, sin embargo, resaltan productos de PCR inespecíficos exhibidos como múltiples bandeos, y aunque se logra diferenciar entre las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct, se decidió realizar una segunda parte confirmatoria mediante digestión enzimática.

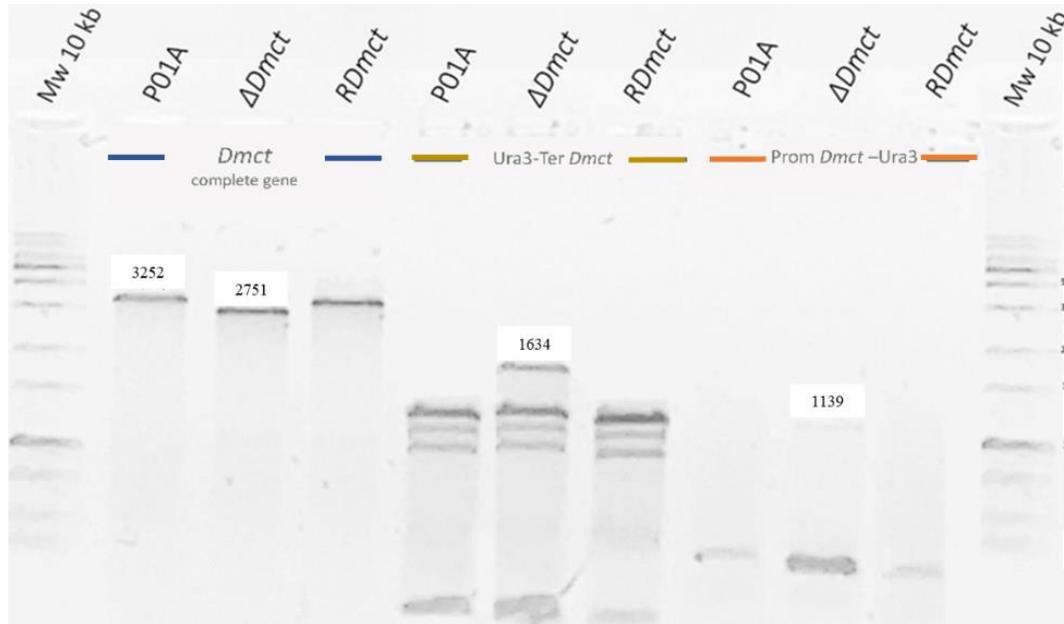


Figura 21. Análisis molecular de la cepa complementaria a partir de la amplificación del gen *dmct* y su región interna. Los resultados aquí presentados fueron realizados con la colonia 16.

Confirmación mediante digestión enzimática

La segunda parte de la confirmación molecular se llevó a cabo mediante la digestión enzimática del fragmento correspondiente al gen *dmct* de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct para esto se llevó a cabo la amplificación del gen *dmct* por PCR punto final en todas las cepas a analizar, para evitar bandas erróneas, los fragmentos fueron escindidos, purificados y cuantificados, asegurando su integridad y pureza.

En la figura 22 se muestra el patrón de bandeo de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct (col.16) con las enzimas EcoRI (Carril 2-4), XhoI (Carril 5-7) y SacI (Carril 8-10). Las diferencias mostradas en el patrón de bandeo de las cepas P01A y RDmct contra la cepa Δ Dmct se relacionan a los cambios en la secuencia amplificada.

Las similitudes en el bandeo de las cepas P01A y RDmct confirman la eliminación completa del gen *Ura3* y la restauración exitosa del gen *dmct*.

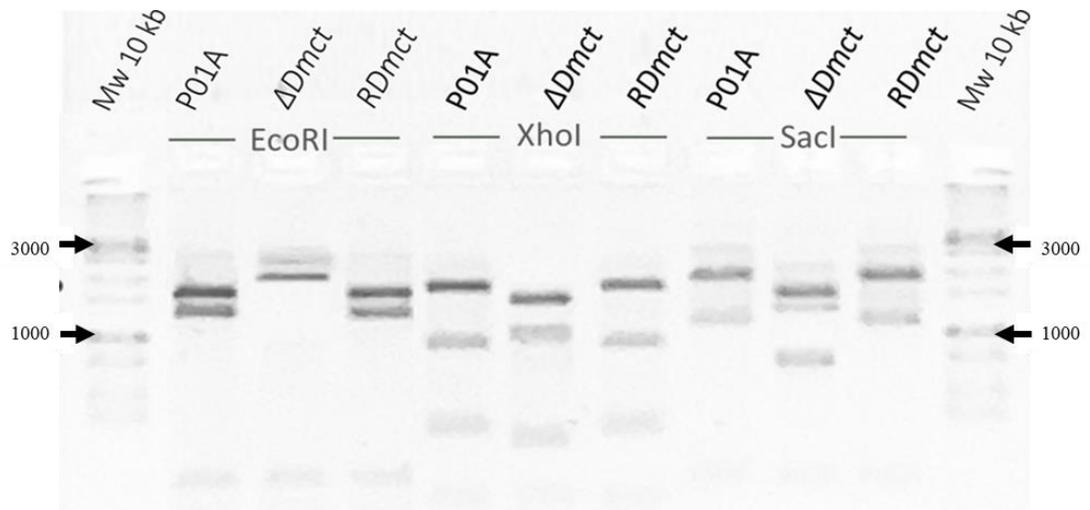


Figura 22. Análisis molecular de la cepa complementaria: digestión con las enzimas de restricción EcoRI, XhoI y SacI.

ETAPA 3

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

7.9 Análisis del crecimiento y morfología de las cepas de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de *Y. lipolytica*.

Una vez confirmada la colonia 16 como cepa complementaria o retromutante “RDmct” el fenotipo de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct se caracterizó, buscando cambios en el comportamiento de las cepas que permitan inferir una posible función al gen *dmct*.

7.9.1 Análisis cualitativo

Para determinar el efecto que la delección del gen *dmct* tiene sobre el crecimiento de *Y. lipolytica*, células en fase de crecimiento exponencial se cultivaron en placas de medio YNB que contenían diferentes concentraciones de cationes metálicos divalentes (iones Cu, Fe y Zn) y el ion calcio. Para tales experimentos se utilizaron las cepas P01A (control), la cepa mutante Δ Dmct (organismo principal a evaluar) y las cepas retromutantes RDmct (RDmct clonas 016, 017 y 021; con gen nativo reintegrado). Las dos cepas complementarias (RDmct 017 y 021) se incluyeron para confirmar el fenotipo y que la respuesta de éstas a las condiciones aplicadas sea debida a la interrupción del gen *dmct* y no a la manipulación técnica y genómica.

En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos y de manera general se observa menor crecimiento de parte de las cinco cepas en los tratamientos realizados respecto a la condición control.

En presencia de diferentes concentraciones del ion calcio, se observa que las cinco cepas toleran la presencia del ion en todas las concentraciones que fueron probadas, el crecimiento de las células de cada una de las cepas probadas fue similar al de la cepa control, resultando que hay una ligera disminución del crecimiento de todas las cepas (incluida la cepa control) en el medio YNB sin calcio adicionado.

Con la adición de cobre al medio YNB, el crecimiento de todas las cepas (incluida la cepa control) se vió afectado. En la figura 23 se puede observar una mayor sensibilidad de la

cepa Δ Dmct a juzgar por su falta de crecimiento en presencia de la concentración de cobre mas baja probada (2 mM). En presencia de concentraciones mayores de Cu (2.5-4 mM), el crecimiento de todas las cepas se ve comprometido respecto al control (sin la adición de cobre).

Con la adición de hierro al medio YNB, resalta la susceptibilidad de las cinco cepas a concentraciones superiores a 6.5 mM del ion, se muestra también mayor crecimiento de la cepa Δ Dmct en las concentraciones 6.5-7.5 mM de hierro respecto a la cepa control.

Finalmente, con la adición de zinc al medio se presenta un retraso en el desarrollo de las colonias conforme aumenta la concentración del ion en el medio, percibiéndose más afectada la cepa Δ Dmct respecto a la cepa control.

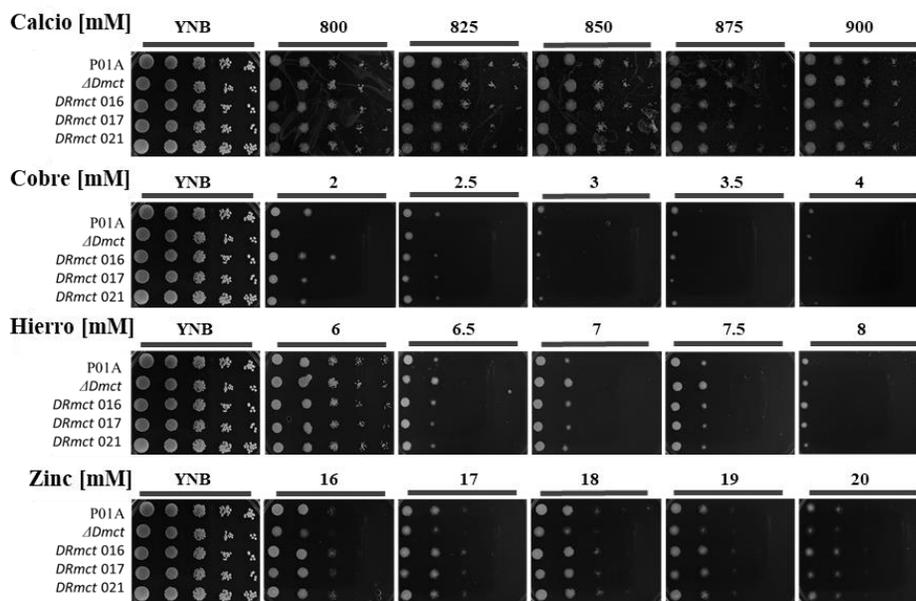


Figura 23. Crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB adicionado con diferentes concentraciones de calcio, cobre, hierro o zinc. Las imágenes corresponden al crecimiento de las células (formación de colonias) después de 72 h cultivadas en las condiciones descritas.

Análisis microscópico de las colonias

Considerando los resultados anteriores, las colonias correspondientes a las cepas parental (P01A) y mutante ($\Delta Dmct$) se observaron mediante microscopía de campo claro, evaluando las diferencias en el crecimiento de las cepas P01A y $\Delta Dmct$ en presencia y ausencia de los diferentes iones.

En el medio control (YNB), generalmente la cepa P01A presenta una morfología colonial de consistencia cremosa blanca con superficie cerebriforme y margen entero/filamentoso, mientras que la cepa $\Delta Dmct$ muestra consistencia cremosa blanca con superficie en forma de cráter y margen filamentoso.

En la figura 24 se compara el crecimiento de ambas cepas en presencia de diferentes concentraciones de calcio (80, 200 y 400 mM) observando patrones de desarrollo similares, tanto en elevación como respuesta morfogénica (formación de micelio). Con la concentración mas baja probada (80 mM de calcio) 80 destacan colonias completamente filamentosas y de manera interesante, se observa que a medida que aumenta la concentración de Ca, disminuye el largo de las ramificaciones.

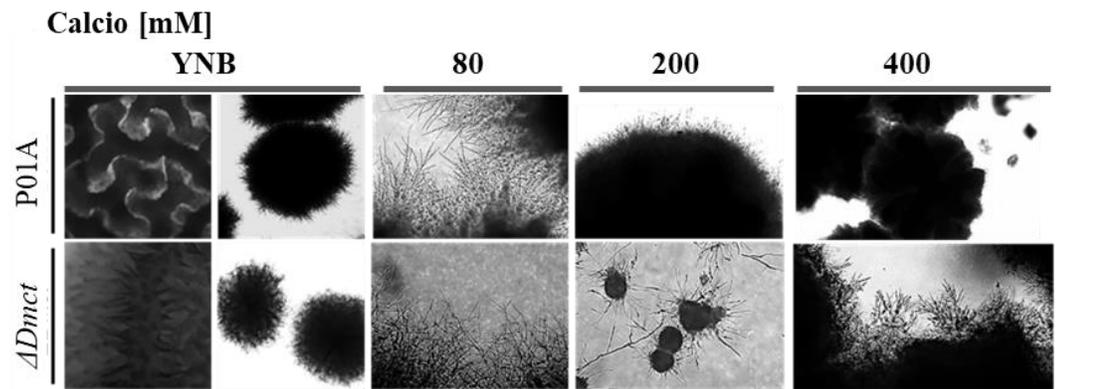


Figura 24. Morfología de las colonias de las cepas P01A y $\Delta Dmct$ de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB adicionado con calcio. Las cepas se cultivaron 72 h en placas de medio YNB adicionado con diferentes concentraciones de calcio (cloruro de calcio). Las imágenes se tomaron con un microscopio de contraste de fases Omax, objetivo 40X.

Los resultados del análisis en presencia de cobre se muestran en la figura 25. Se observa que a 2mM tanto la cepa P01A como la cepa $\Delta Dmct$ forman filamentos largos y desordenados; a partir de la concentración 4 mM y conforme ésta incrementa, la viabilidad celular tiene un marcado deceso, observándose solo pocas células en desarrollo, las cuales presentan poca o nula formación de filamentos.

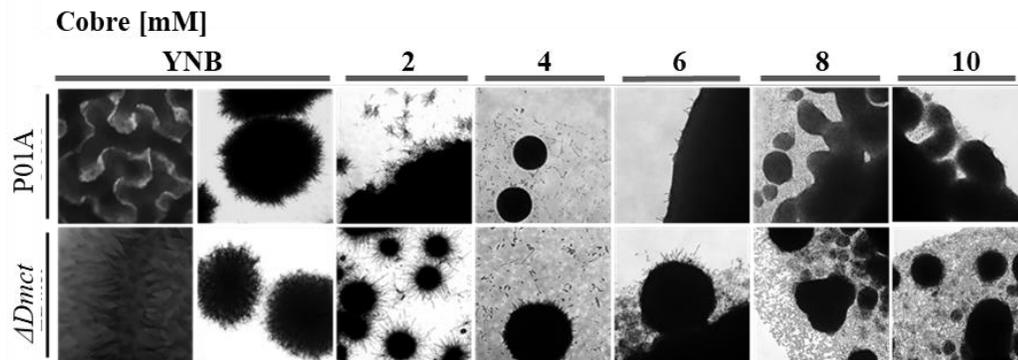


Figura 25. Morfología de las colonias de las cepas P01A y $\Delta Dmct$ de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB adicionado con cobre. Las cepas se cultivaron 72 h en placas de medio YNB adicionado con diferentes concentraciones de cobre (sulfato de cobre). Las imágenes se tomaron con un microscopio de contraste de fases Omax, objetivo 40X.

En la figura 26 se muestra el efecto de la adición de hierro. Contrario a lo observado con la adición de Ca o Cu, cuando las cepas P01A y $\Delta Dmct$ se cultivaron en presencia de hierro, ambas muestran ligeras diferencias en el desarrollo; en concentraciones bajas de este metal, las colonias correspondientes a la cepa P01A muestran crecimiento filamentos/granular, y conforme aumenta la concentración de hierro se presenta ausencia de micelio, mientras que a partir de 8 mM la viabilidad de las células es notoriamente afectada. Por otro lado, en las colonias correspondientes a la cepa $\Delta Dmct$ se observa que en bajas concentraciones de hierro las colonias tienen un crecimiento colonial filamentos/granular similar a las de la cepa p01A y conforme aumenta la concentración de Fe se forman colonias de margen entero. En las colonias de la cepa mutante, la viabilidad celular se ve comprometida a partir de la adición de 6mM de Fe lo que sigue una mayor susceptibilidad de esta cepa a la presencia del hierro.

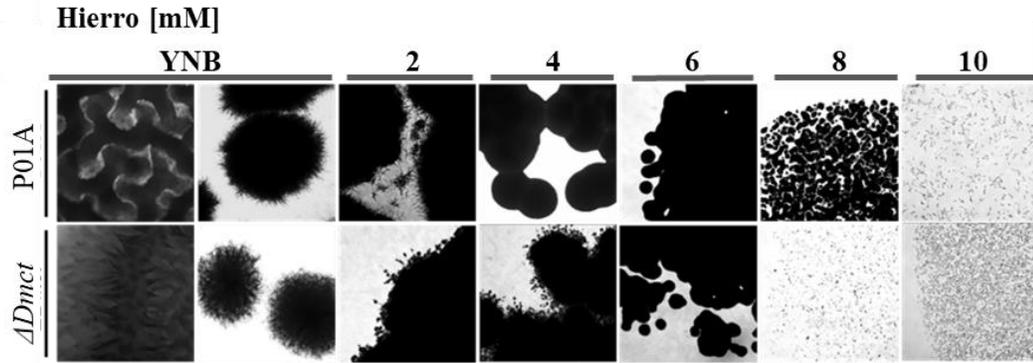


Figura 26. Morfología de las colonias de las cepas P01A y $\Delta Dmct$ de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB adicionado con hierro. Las cepas se cultivaron 72 h en placas de medio YNB adicionado con diferentes concentraciones de hierro (sulfato de hierro). Las imágenes se tomaron con un microscopio de contraste de fases Omax, objetivo 40X.

Cuando se analizó el efecto de la adición de zinc en el crecimiento de las cepas (Figura 27), Se observó que ambas muestran crecimiento en forma de micelio ramificado largo y desordenado. A medida que se incrementó la concentración de Zn, se observó que las colonias formadas son similares a las de la cepa control con la presencia de filamentos en los bordes, siendo estos más prominentes en la cepa $\Delta Dmct$.

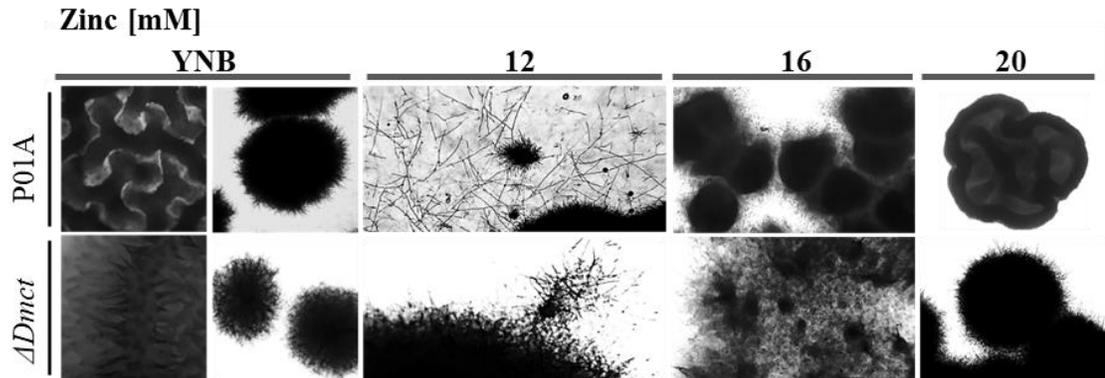


Figura 27. Morfología de las colonias de las cepas P01A y $\Delta Dmct$ de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB adicionado con zinc. Las cepas se cultivaron 72 h en placas de medio YNB adicionado con diferentes concentraciones de zinc (sulfato de zinc). Las imágenes se tomaron con un microscopio de contraste de fases Omax, objetivo 40X.

7.9.2 Análisis cuantitativo

Crecimiento celular de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct en medio líquido con presencia o ausencia de cationes

Para analizar cuantitativamente el crecimiento, las células de las cepas parental (P01A), mutante (Δ Dmct) y retromutante (RDmct) se cultivaron en medio líquido YNB adicionado con diferentes concentraciones de los cationes calcio, cobre, hierro y zinc o en ausencia de éstos. El crecimiento se determinó espectrofotométricamente ($OD_{600\text{ nm}}$) a las 20 horas de cultivo.

En la figura 28 se muestra que el crecimiento de las tres cepas es menor conforme aumenta la concentración calcio en el medio.

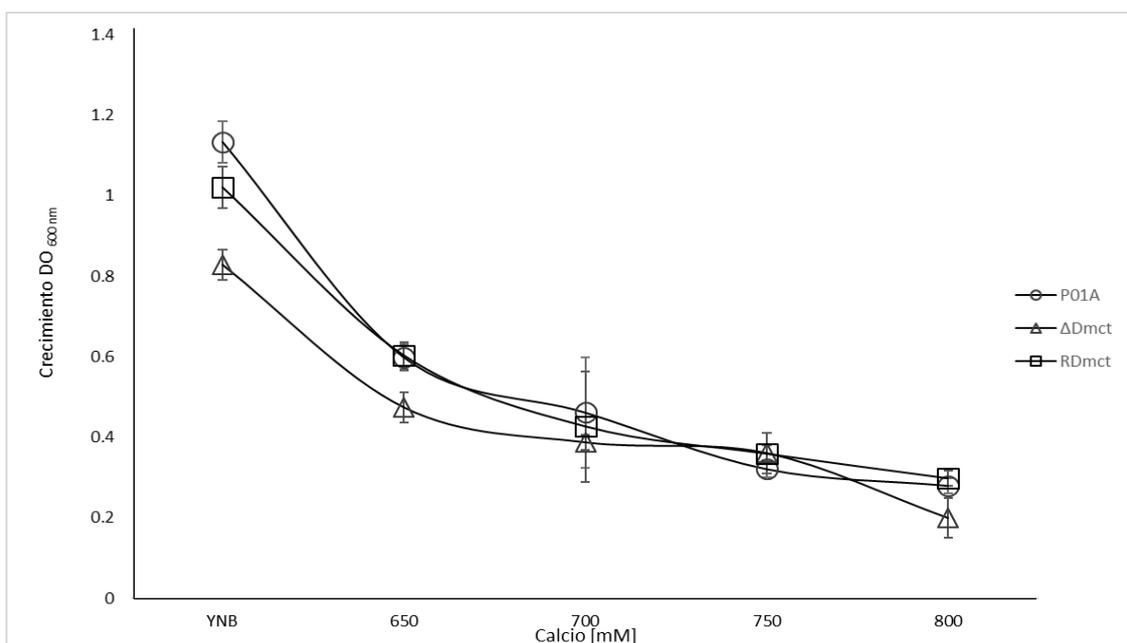


Figura 28. Comparación del crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de *Y. lipolytica* en medio adicionado con calcio. Las cepas P01a, Δ Dmct y RDmct se cultivaron en medio líquido YNB adicionado con diferentes concentraciones de calcio. La $OD_{600\text{ nm}}$ se determinó a las 20 h de incubación. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos; las barras sobre cada punto corresponden al error estándar.

En la figura 29 se observa que las tres cepas tienen la misma tendencia de disminuir el crecimiento a medida que aumenta la concentración de cobre en el medio; sin embargo, a 4 mM la cepa mutante Δ Dmct crece 4 veces mas que la cepa P01A y RDmct.

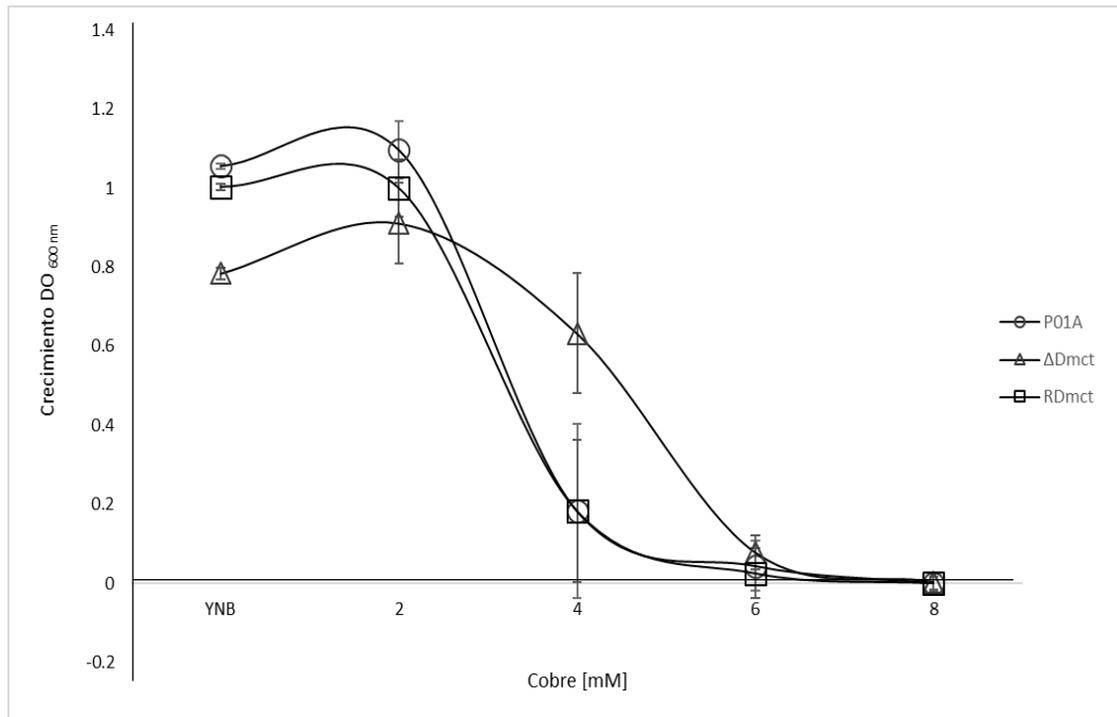


Figura 29. Comparación del crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de *Y. lipolytica* en medio adicionado con cobre. Las cepas P01a, Δ Dmct y RDmct se cultivaron en medio líquido YNB adicionado con diferentes concentraciones de calcio. La OD_{600 nm} se determinó a las 20 h de incubación. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos; las barras sobre cada punto corresponden al error estándar.

La figura 30 se muestra el crecimiento en presencia de hierro en donde el ensayo se vio afectado debido a que el inóculo precipitó el sulfato de hierro soluble presente en el medio, por lo que la determinación espectrofotométrica resultó comprometida.

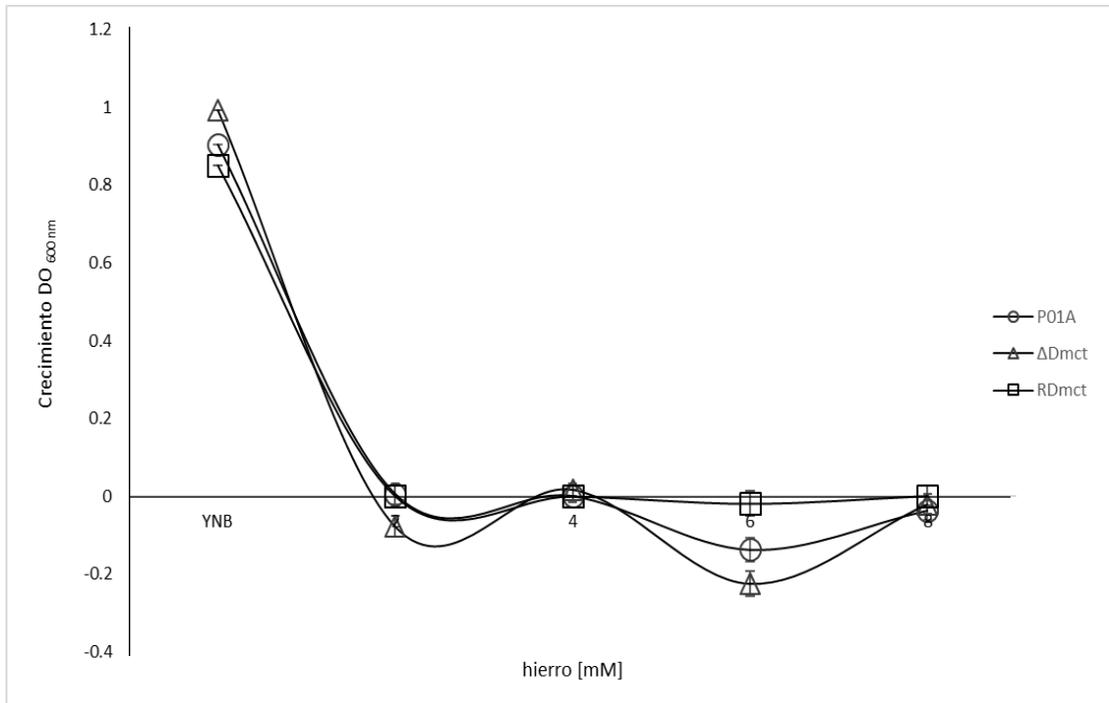


Figura 30. Comparación del crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de *Y. lipolytica* en medio adicionado con hierro. Las cepas P01a, Δ Dmct y RDmct se cultivaron en medio líquido YNB adicionado con diferentes concentraciones de hierro. La OD_{600 nm} se determinó a las 20 h de incubación. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos; las barras sobre cada punto corresponden al error estándar.

Finalmente, los resultados del crecimiento de las tres cepas en medio adicionado con zinc (figura 31) muestran que la cepa P01A y RDmct mantienen la tendencia observada en los demas tratamientos de disminuir el crecimiento de acuerdo con el aumento de concentración de zinc libre en el medio, en contraste, la cepa mutante Δ Dmct mantiene su crecimiento constante independientemente la concentración de zinc lo que sugiere algún evento intracelular de tolerancia al aumento de este ion.

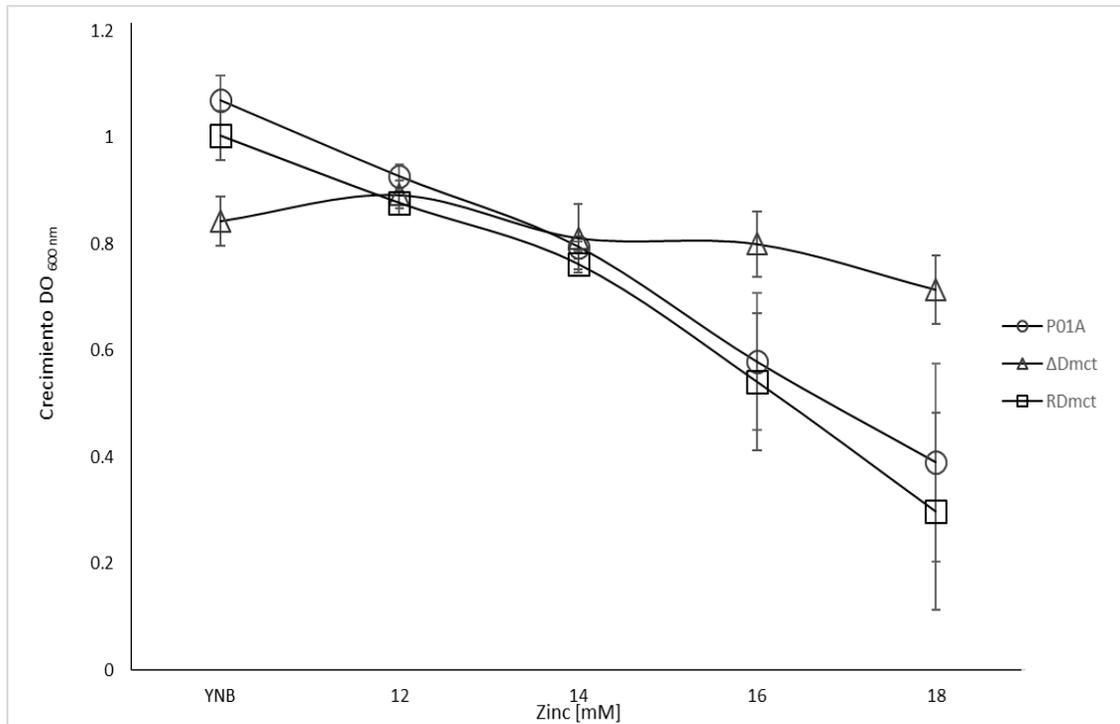


Figura 31. Comparación del crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct de *Y. lipolytica* en medio adicionado con zinc. Las cepas P01a, Δ Dmct y RDmct se cultivaron en medio líquido YNB adicionado con diferentes concentraciones de calcio. La OD_{600 nm} se determinó a las 20 h de incubación. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos; las barras sobre cada punto corresponden al error estándar.

Análisis de la morfología celular en presencia de diferentes concentraciones de cationes divalentes

A partir de la observación de las células cultivadas en medios con diferentes concentraciones de iones utilizando microscopía de campo claro, se evaluaron las diferencias en el crecimiento microscópico.

En la figura 32 se observa la respuesta fenotípica de las células en presencia de calcio. A nivel microscópico muestra que concentraciones de 650-700 mM inducen en la cepa mutante $\Delta Dmct$ cambios dimórficos (formación de micelio) los cuales se reprimen en concentraciones superiores del ion.

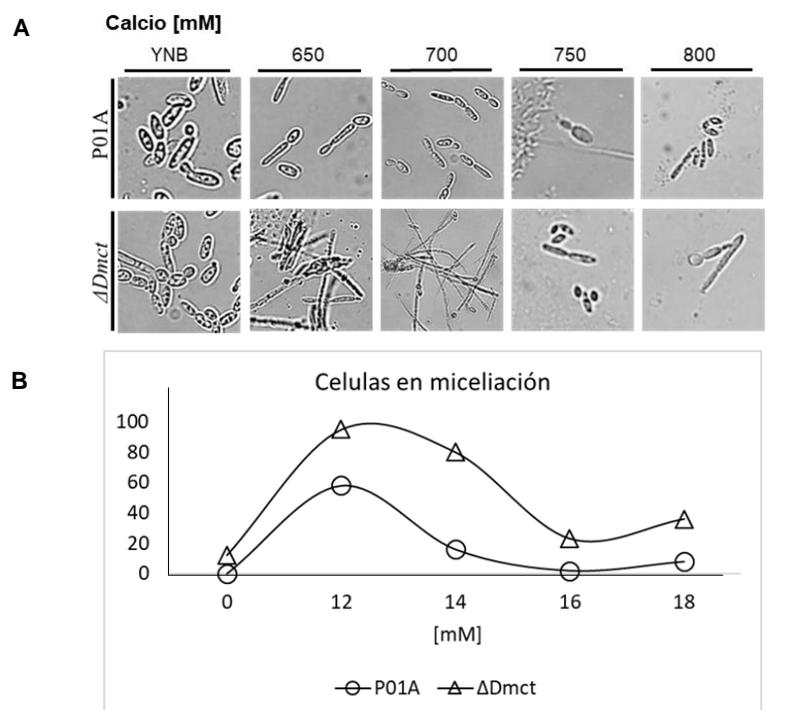


Figura 32. Morfología celular de las cepas P01A y $\Delta Dmct$ de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB adicionado con calcio. A) Las cepas se cultivaron durante 20 h en medio YNB líquido adicionado con diferentes concentraciones de calcio (cloruro de calcio), las fotografías se obtuvieron mediante microscopía de campo claro utilizando la tinción de azul de metileno. En el gráfico inferior (B) se muestra el porcentaje de células en miceliación.

En la figura 33 se observa la respuesta fenotípica de las células en presencia de cobre, en el panel A se muestra la morfología que presentan ambas cepas, resaltando las concentraciones 6 mM y 4 mM para la cepa p01A y $\Delta Dmct$ respectivamente en donde se presentó aglomeración de las células, misma que no se observó en ninguna otra condición. En el gráfico inferior (B) se observa el porcentaje de formación de micelio, a bajas concentraciones del metal (0-2mM) las células de la cepa mutante presentan morfología alargada similar a un micelio, mientras que P01A se mantiene en forma de levadura, a partir de 4 mM ambas cepas tienen comportamiento similar.

El comportamiento de ambas cepas ante la presencia de cobre se percibe como un constante mecanismo de selección de aquellas células que son capaces de adaptarse más rápido a la toxicidad del medio.

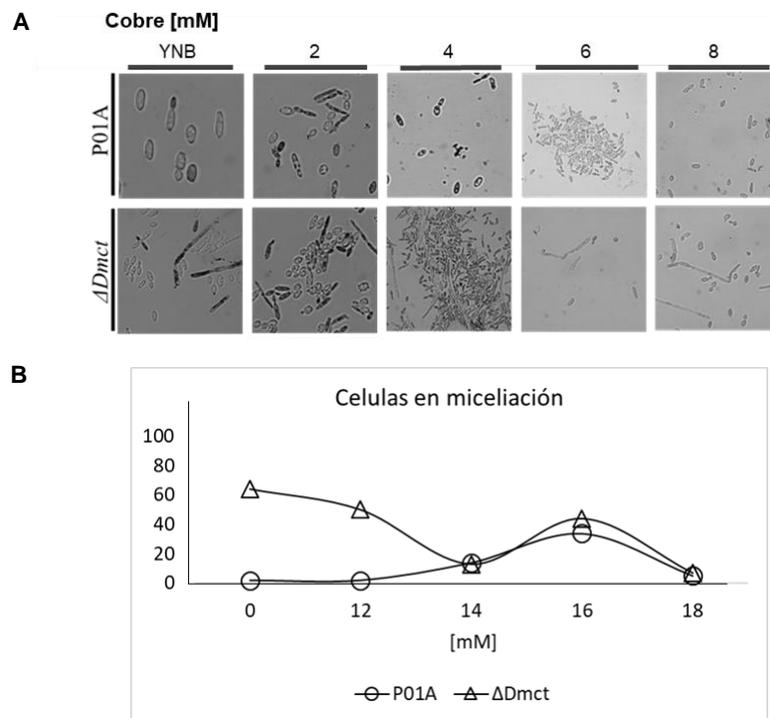


Figura 33. Morfología celular de las cepas P01A y $\Delta Dmct$ de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB adicionado con cobre. A) Las cepas se cultivaron durante 20 h en medio YNB líquido adicionado con diferentes concentraciones de cobre (sulfato de cobre), las fotografías se obtuvieron mediante microscopía de campo claro utilizando la tinción de azul de metileno. En el gráfico inferior (B) se muestra el porcentaje de células en miceliación.

En la figura 34 se observa la respuesta fisiológica de las cepas P01A y Δ Dmct en presencia de hierro, se presentó un evento particular no mostrado con ningún otro ion, donde al realizar el inóculo de las cepas P01A y Δ Dmct, estas precipitaron completamente el hierro soluble y pasadas las 20 horas de incubación con agitación, microscópicamente se observa como el hierro en forma de sal no soluble, rodea la periferia de la célula, dejando libre de hierro al medio. Por tal motivo fue imposible evaluar el porcentaje de miceliación, sin embargo, se confirmó la viabilidad de la célula después de las 20 h utilizando la tinción de azul de metileno.

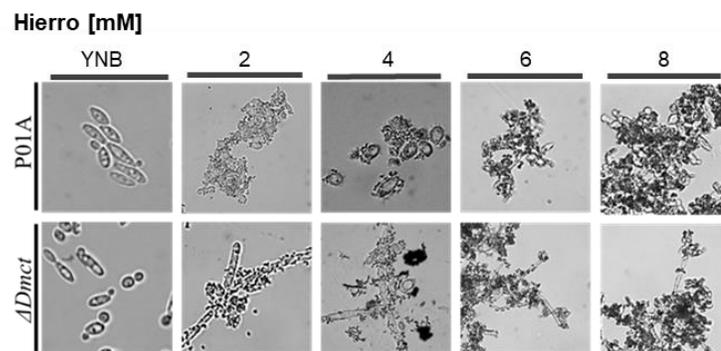


Figura 34. Morfología celular de las cepas P01A y Δ Dmct de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB adicionado con hierro. Las cepas se cultivaron durante 20 h en medio YNB líquido adicionado con diferentes concentraciones de hierro (sulfato de hierro), las fotografías se obtuvieron mediante microscopía de campo claro utilizando la tinción de azul de metileno.

Finalmente, en la figura 35 se presenta la respuesta fenotípica de las células en presencia de zinc, en el panel A se observa que, a pesar del aumento en la concentración de este ion en el medio, la cepa P01A se mantiene en forma de levadura, en cambio la cepa Δ Dmct a partir de 16 mM se inducen los mecanismos de morfogénesis en al menos el 80% de las células (B).

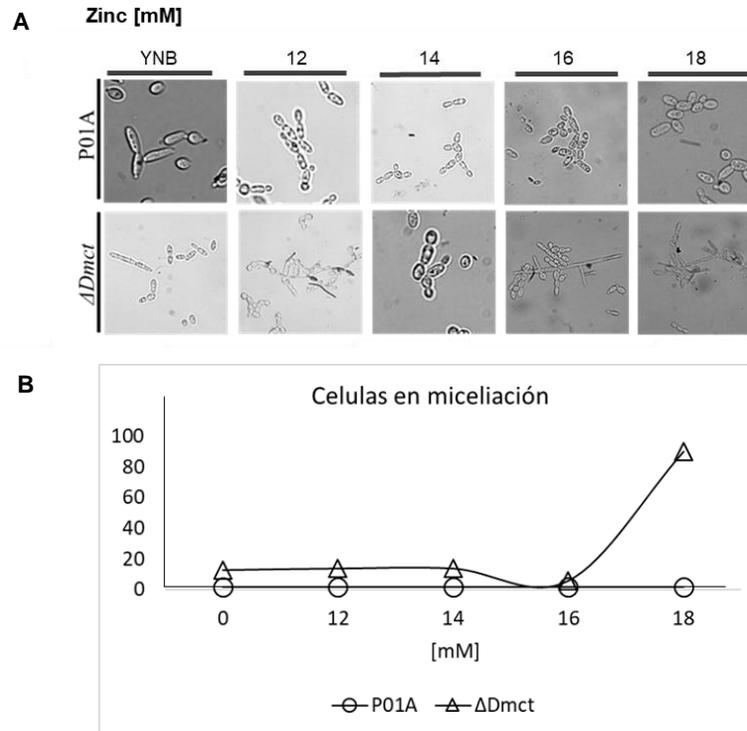


Figura 35. Morfología celular de las cepas P01A y Δ Dmct de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YNB adicionado con zinc. A) Las cepas se cultivaron durante 20 h en medio YNB líquido adicionado con diferentes concentraciones de zinc (sulfato de zinc), las fotografías se obtuvieron mediante microscopía de campo claro utilizando la tinción de azul de metileno. En el gráfico inferior (B) se muestra el porcentaje de células en miceliación.

Análisis del crecimiento en medio mínimo carente de cationes divalentes

Para analizar el efecto que tiene la ausencia de cationes metálicos divalentes en medio líquido, se hicieron dos series de experimentos independientes, ambos partiendo de células previamente crecidas y cultivadas en medio mínimo mineral base, en el primer experimento las células se inocularon directamente en los medios que carecían cada uno de los metales. En la segunda serie de experimentos, las condiciones fueron similares pero las células fueron tratadas previamente con un ciclo de cuatro horas de privación de nutrientes.

Los resultados obtenidos de la primera serie se presentan en la figura 36; se observa que en ausencia de calcio no hay diferencia el crecimiento entre las tres cepas. Por otro lado, la ausencia de hierro limita el crecimiento de la cepa $\Delta Dmct$ mientras que en ausencia de cobre y zinc el crecimiento de la cepa mutante es mayor que el de la cepa parental.

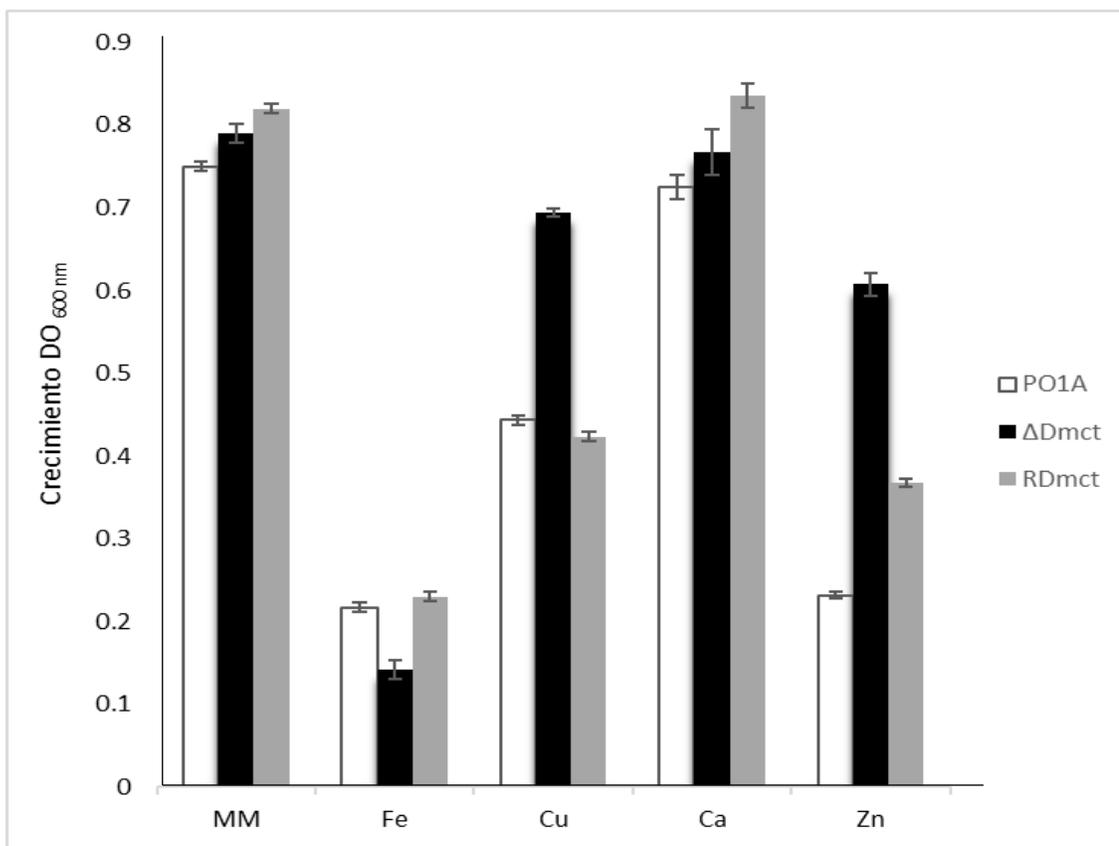


Figura 36. Crecimiento de las cepas P01A, $\Delta Dmct$ y RDmct en medio YNB líquido sin metales. La DO_{600 nm} se determinó a las 20 h de incubación. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos; las barras sobre cada punto corresponden al error estándar.

Los resultados de la segunda serie experimental se muestran en la figura 37. Se puede observar que después de la privación de nutrientes y en ausencia del cobre, las tres cepas (parental, mutante y retromutante) tienen un crecimiento menor que las células del grupo control (medio MM); contrario a esto, en ausencia de calcio las tres cepas presentaron mayor crecimiento que el grupo control.

En presencia de hierro y zinc, la cepa mutante (carente del gen *dmct*) tuvo un crecimiento menor que la cepa parental y que la cepa retromutante.

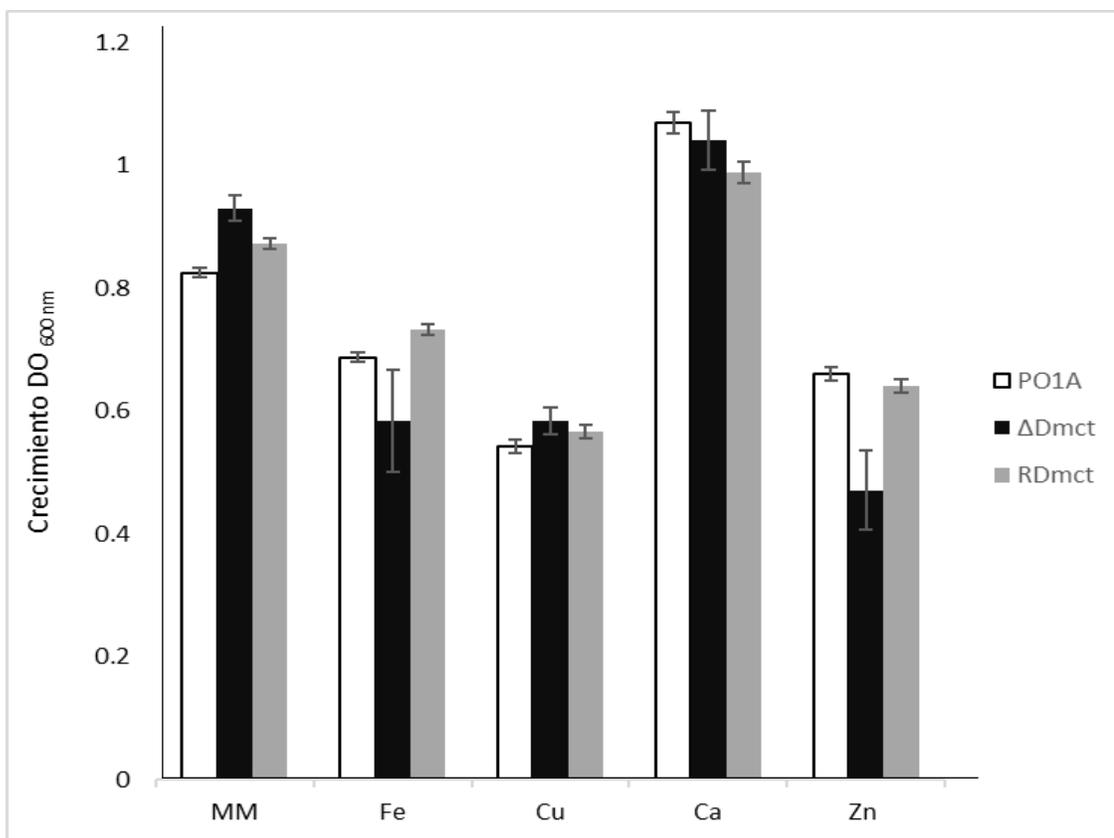


Figura 37. Crecimiento de las cepas P01A, Δ Dmct y RDmct con privación de nutrientes en medio YNB líquido sin metales. La $DO_{600\text{ nm}}$ se determinó a las 20 h de incubación, el ciclo de privación de nutrientes que incluía fuente de nitrógeno, carbono y iones durante 4 h previas a la inoculación en medio sin cada uno de los metales. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos; las barras sobre cada punto corresponden al error estándar.

7.9.3 Análisis de la acumulación intracelular de cationes metálicos divalentes

Para evaluar cambios en los patrones de acumulación intracelular de metales y en la morfología celular de las cepas P01A y Δ Dmct, se realizaron ensayos con microscopía de fluorescencia utilizando los siguientes fluoróforos: 1. Phen green Sk diacetato, con afinidad por los cationes metálicos divalentes intracelulares, 2. Blanco de calcofluor, con afinidad por la cleulosa y quitina y 3. Syto 9 con afinidad por los ácidos nucleicos, permitiendo teñir núcleos y delimitando su posición dentro de la célula para evitar la confusión de éste con vacuolas en las tinciones de metales.

En la figura 38, se muestran imágenes que permiten comparar los resultados obtenidos con los diferentes fluoróforos. Para estos análisis las cepas P01A y Δ Dmct se cultivaron

en medio YNB y se visualizaron con microscopía de campo claro (panel A), en donde se destaca la mezcla de células de morfología levaduriforme y células ligeramente alargadas. En el panel B se observa el posicionamiento de núcleos, logrando diferenciar las zonas que albergan el núcleo (N) y las vacuolas (V). En el panel C se observa con mayor detalle la morfología celular antes descrita; es evidente que dicha morfología es similar en ambas cepas. Finalmente, el panel D muestra la tinción con Pheen green Sk dirigido a los sitios de acumulación de cationes, el medio YNB al ser un medio mínimo para levaduras, contiene cantidades mínimas de estos cationes por lo que no es de esperarse la acumulación de éstos, debido a lo cual se manifiesta la ausencia de fluorescencia.

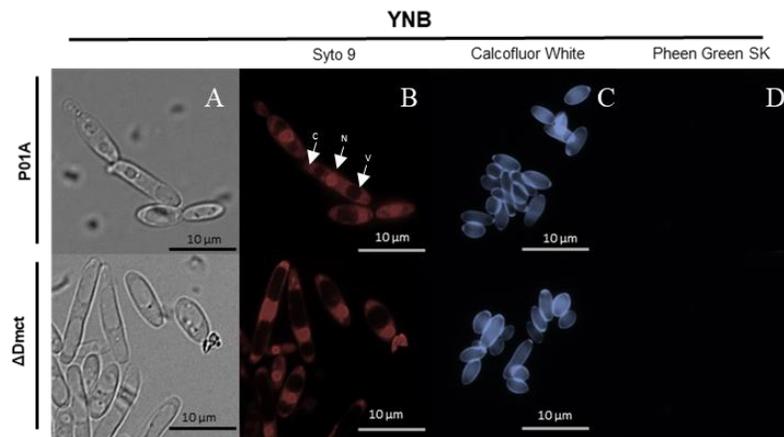


Figura 38. Comparación de la posición de núcleos, morfología y distribución de la acumulación de metales intracelulares de las cepas P01A y Δ Dmct de *Y. lipolytica*. Las células corresponden a cultivos de 20 h en medio YNB-líquido. Las células se tiñeron con Syto 9 (Panel B), “N” se refiere a núcleo, “V” se refiere a vacuolas y “C” se refiere a citoplasma, blanco de calcofluor (Panel C) y Phen Green SK (Panel D) y fueron observadas y fotografiadas con un microscopio Leica M6000 equipado con fluorescencia.

Para determinar el efecto de la adición de cobre en la fisiología de las cepas parental (P01A) y mutante (Δ Dmct) de *Y. lipolytica*. Las células correspondientes a cada cepa se cultivaron durante 20 horas en medio YNB adiconado con 4 mM de Cu. En la figura 39 se observan los resultados de la microscopía en campo claro (panel A); la morfología de la cepa P01A es similar a la del grupo control (Figura 39, Panel A). Contrario a esto, las células correspondientes a la cepa mutante (Δ Dmct) presentan una combinación de células levaduriformes, células alargadas e incluso algunas parecieran estar en dimorfismo formando filamentos de longitud variable (Figura 39, panel inferior). El análisis del cobre intracelular con el fluoróforo Phen green SK (panel B) permite observar que el metal

incorporado a las células parentales se distribuye homogéneamente en el interior de éstas, mientras que en las células mutantes ($\Delta Dmct$) hay zonas de acumulación de la fluorescencia sugiriendo la acumulación del ion cobre. La tinción con blanco de calcoflúor (Panel C) no mostró diferencias en la morfología de las cepas, demostrando que la delección del gen *dmct* no produce cambios estructurales en la pared celular.

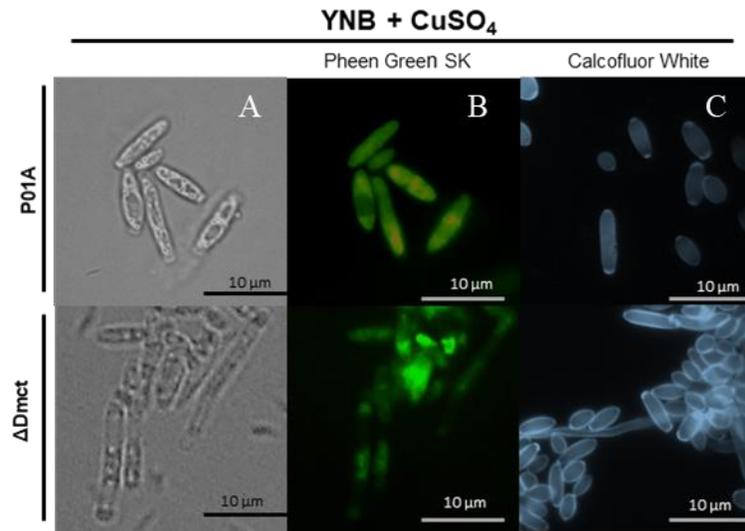


Figura 39. Efecto de la adición de cobre en la distribución intracelular del metal y la morfología celular de las cepas P01A y $\Delta Dmct$ de *Y. lipolytica*. . Las células corresponden a cultivos de 20 h en medio YNB-líquido adicionado con sulfato de cobre a 4 mM. Las células se tiñeron con Phen Green Sk (Panel B) y blanco de calcoflúor (Panel C) y fueron observadas y fotografiadas con un microscopio Leica M6000 equipado con fluorescencia.

En la figura 40 se observa el efecto fisiológico de la adición de hierro (4mM) al cultivo celular de las cepas P01A y $\Delta Dmct$ de *Y. lipolytica*. La morfología observada en el panel A muestra que en ambas cepas hay células en forma de levadura, algunas células ligeramente alargadas (en división), células dimórficas aberrantes y en la cepa parental algunas en forma de hifa. En el tratamiento con Phen green SK (panel B) se destaca la tinción de los sitios de acumulación de metales, revelando que la distribución del hierro no se limita solo a las vacuolas, sino también al citoplasma; según la intensidad de la fluorescencia ambas regiones contienen zonas con mayor abundancia de hierro. La tinción con blanco de calcoflúor (Panel C) deja ver algunas células con crecimiento de tipo hifa en la cepa P01A mientras que la cepa mutante presenta también micelio aberrante.

Comparando la morfología celular de ambas cepas e integrando la tinción de los cúmulos de hierro, se detectó la deficiencia en el transporte y acumulación de hierro en aquellas células que presentan dimorfismo aberrante, siendo mas prominente este evento en la cepa mutante, mientras que las células de la cepa P01A muestra mayor uniformidad en la disposición del metal en su interior.

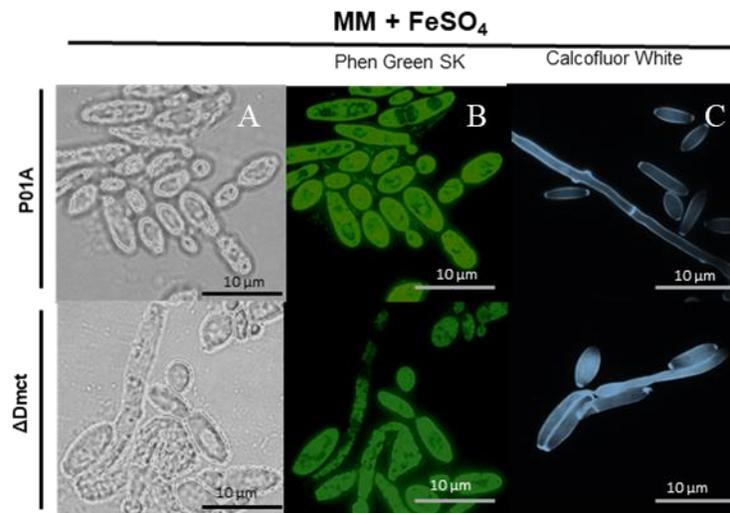


Figura 40. Efecto de la adición de hierro en la distribución intracelular del metal y la morfología celular de las cepas P01A y Δ Dmct de *Y. lipolytica*. Las células corresponden a cultivos de 20 h en medio YNB-líquido adicionado con sulfato de hierro a 4 mM. Las células se tiñeron con Phen Green Sk (Panel B) y blanco de calcoflúor (Panel C) y fueron observadas y fotografiadas con un microscopio Leica M6000 equipado con fluorescencia.

En la figura 41 se observa el efecto fisiológico de las células ante la adición de zinc (16 mM). La microscopía de campo claro (Panel A) muestra que las células de ambas cepas presentan morfología similar; se pueden ver células levaduriformes, células alargadas y algunas formando micelio septado. En las células tratadas con Phen green SK (Panel B) se observa la acumulación intracelular de zinc de forma homogénea mayormente en citoplasma, aunque se distinguen acumulaciones en vacuolas tanto en la cepa parental como en la mutante. Además, la tinción con blanco de calcofúlur muestra que en ambas ceas algunas células se encuentran diferenciadas, sin embargo, el fenotipo no es claro. Similar a lo observado en la figura anterior, la disminución en la fluorescencia de aquellas

células diferenciadas sugiere una alteración en el transporte de zinc en la cepa mutante ($\Delta Dmct$).

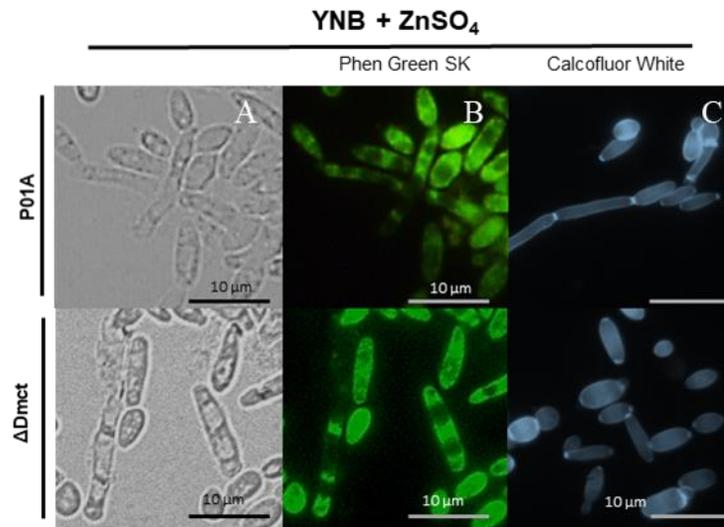


Figura 41. Efecto de la adición de zinc en la distribución intracelular del metal y la morfología celular de las cepas P01A y $\Delta Dmct$ de *Y. lipolytica*. Las células corresponden a cultivos de 20 h en medio YNB-líquido adicionado con sulfato de zinc a 16 mM. Las células se tiñeron con Phen Green Sk (Panel B) y blanco de calcoflúor (Panel C) y fueron observadas y fotografiadas con un microscopio Leica M6000 equipado con fluorescencia.

7.10 Análisis de genes de respuesta compensatoria a *dmct*

La falta de un fenotipo claro en la cepa mutante ($\Delta Dmct$) da indicios de que la ausencia del gen *dmct* desencadena una posible actividad compensatoria de proteínas involucradas en las vías de transporte de metales. Es por esto por lo que se decidió hacer el análisis de los genes involucrados en el transporte y tráfico de metales presentes en el genoma de *Y. lipolytica*. Se revelaron 27 genes dispersos en los seis cromosomas que conforman su genoma y ninguno ha sido anotado aún. En la Tabla 15 se indica el cromosoma en donde se ubican, el nombre sistémico del gen, a que proteína se asemeja, su posible función y los dominios funcionales presentes.

Tabla 15. Genes con posible actividad compensatoria en respuesta a la ausencia del gen *dmct*

Cr	Gen	Similar a	Posible función	Dominios funcionales
A	<i>a11605g</i>	Transportador MSF	Trasporte de pequeñas moléculas por gradiente	Superfamilia MSF
	<i>a14883g</i>	Transportador de sideróforo de tipo ferricromo	homeostasis del hierro	Superfamilia MSF
B	<i>b06094g</i>	Transportador de Ca ²⁺ rdgB	Unión a metales, transporta calcio	Superfamilia DDHD
	<i>b17864g</i>	Transportador de absorción de potasio de alta afinidad	Transporte de potasio	Superfamilia 2a38euk
	<i>b19250g</i>	Transportador de sideróforo de tipo ferricromo	homeostasis del hierro	Superfamilia MSF
C	<i>c02541g</i>	Transportador MSF	Especificidad desconocida	Superfamilia MSF
	<i>c04411g</i>	Proteína SMF1/E	transportador de metales divalentes y trivalentes	Superfamilia SLC5-6-like_sbd
	<i>c06105g</i>	Transportador MSF	Especificidad desconocida	Superfamilia MSF
	<i>c09823g</i>	Transportador MSF	Anión-catión simporter	Superfamilia MSF
	<i>c10311g</i>	Transportador de potasio de alta afinidad	Transporte de potasio	Superfamilia K-Trans
	<i>c10670g</i>	Transportador MSF	Especificidad desconocida	Superfamilia MSF
	<i>C12254g</i>	Transportador de hierro en mitocondria MMT2	Transporte de metales catiónicos divalentes	Superfamilia SelP_N, dominio FieF
	<i>c16225g</i>	Transportador MSF	Especificidad desconocida	Superfamilia MSF
	<i>c17105g</i>	Transportador MSF	Especificidad desconocida	Superfamilia MSF
	<i>c18051g</i>	Proteína de resistencia a metales YCFI	Transporte vacuolar, aumento tolerancia a metales	Superfamilia MRP_assoc_pro
D	<i>d00319g</i>	Transportador de cationes divalentes ALR1	Transporte de cationes divalentes	Superfamilia Alr1p-like
	<i>d20064g</i>	Transportador MSF	Especificidad desconocida	Superfamilia MSF
	<i>d24651g</i>	Transportador MSF	Especificidad desconocida	Superfamilia MSF
	<i>d26818g</i>	Proteína transportadora SMF2	Transporte de manganeso	Dominio nramp
E	<i>e00748g</i>	Transportador Zrt2	Transportado de zinc	Superfamilia Zip
	<i>e00462g</i>	Transportador Alr1	Transporte de cationes divalentes	Superfamilia Alr1p-like
	<i>e11473g</i>	Transportador HAK1	Transportado de potasio	Superfamilia K-Trans
	<i>e14234g</i>	Transportador YBT1	Involucrado con el Ca ⁺ y la resistencia a metales	Superfamilia MRP_assoc_pro
F	<i>f19118g</i>	Transportador de sideróforo de tipo ferricromo	homeostasis del hierro	Superfamilia MSF
	<i>f20922g</i>	Transportador de sideróforo de tipo ferricromo	homeostasis del hierro	Superfamilia MSF
	<i>f27709g</i>	Transportador de sideróforo de tipo ferricromo	homeostasis del hierro	Superfamilia MSF
	<i>f29711g</i>	Transportador MSF	Especificidad desconocida	Superfamilia MSF

Los genes y las correspondientes proteínas fueron obtenidos a partir del genoma de *Y. lipolytica* CLIB122 disponible en NCBI y confirmados bioinformáticamente mediante el análisis de su dominio funcional en la Base de Datos de Dominios Funcionales (CDD).

VIII. DISCUSIÓN

Yarrowia lipolytica es una levadura de gran interés para la industria biotecnológica. Su riqueza a nivel genómico se traduce en un metabolismo privilegiado, capaz de incorporarse en múltiples procesos como la producción de proteínas unicelulares, lípidos y diversas moléculas como ácido cítrico, eritritol, manitol, ácido propílico, entre otras; todo esto lo logra gracias a los eficientes mecanismos de transporte y secreción con los que cuenta. Hoy en día, son pocos los mecanismos de transporte descritos en *Y. lipolytica*, en el tema particular del transporte de metales aún se desconocen los mecanismos de transporte de cationes, niveles de tolerancia y efectos fisiológicos ante la toxicidad de éstos. En este trabajo se analizaron los efectos que la ausencia de la proteína codificada por el gen *dmct* (Yali_F19734g) tiene sobre el crecimiento, dimorfismo y la especificidad en el transporte de iones.

La proteína codificada por el gen *dmct* (Yali_F19734g) pertenece a la familia de los transportadores de cationes

Análisis de enriquecimiento

Los resultados del análisis de enriquecimiento bioinformático permiten predecir la localización subcelular de la proteína codificada por el gen *dmct*. Además, tales resultados dejan ver la posibilidad de que esta proteína esté presente en distintas membranas intracelulares como la membrana plasmática, vacuolas, aparato de Golgi y retículo endoplásmico a juzgar por la presencia de regiones transmembranales y la homología con proteínas de ubicación conocida en estos organelos, como las que se muestran en la tabla 12 y en la tabla complementaria 16. Diversos autores han reportado proteínas similares a la estudiada en este trabajo presentes en membranas de mitocondrias y membrana plasmática de células procariotas y eucariotas, Clemens y colaboradores (2002) han reportado proteínas de esta familia en membranas vacuolares y de retículo endoplásmico en levaduras, lo que demuestra que las proteínas de este grupo se presentan en casi cualquier membrana intracelular (Haney et al. 2005).

Al analizar la topología de la proteína codificada por el gen *dmct*, se encontraron cinco dominios transmembranales completos y un dominio incompleto (Tabla 14, Figura 12); además, los datos sugieren que los extremos amino y carboxilo de la proteína predicha están orientados hacia el citoplasma. Estos resultados son acordes a los ya reportados en otros estudios (Wei y Fu 2005; Montani y col. 2007) donde se reporta la presencia de seis dominios transmembranales y ambos extremos terminales hacia el citoplasma.

La práctica más común para la asociación de funciones de una proteína no caracterizadas es mediante la búsqueda de genes homólogos ortólogos, es decir, genes del mismo origen presente en otras especies que previamente ya han sido caracterizados mediante métodos experimentales, lo que nos permite extrapolar los resultados de otros grupos de trabajo con los nuestros. Tratando de rehacer la historia evolutiva del gen *dmct* se construyó el filoma o árbol filogenético mostrado en la figura 13, demostrando que existe una relación cercana de este gen con genes presentes en géneros como *Candida*, *Debaryomyces*, *Cyberlindnera* y *Kuraishia*. A excepción de *Candida*, la mayoría de estos géneros no son organismos que se encuentren completamente caracterizados, esta construcción evolutiva permitió ver la conservación de este gen en organismos que comparten el mismo orden de *Yarrowia*, Saccharomycetales, demostrando un evento de divergencia en niveles taxonómicos inferiores. No obstante, existe una característica particular que comparten estos cinco géneros: la tolerancia ante diversos escenarios, un ejemplo, el género *Debaryomyces* está caracterizado por cepas que resultan osmotolerantes, halotolerantes y xerotolerantes, si volvemos a las características de *Yarrowia*, es una levadura poliextremófila, es decir, tolerante en múltiples aspectos, la tolerancia de estos organismos es incrementada por los sistemas de secreción los cuales están mediados en gran medida por transportadores transmembranales que se encargan de movilizar el agente causante de toxicidad hacia el exterior de la célula o almacenes internos (Almagro *et al.* 2001). Esto nos permite inferir que la proteína codificada por el gen *dmct* en *Y. lipolytica* no es un gen esencial para el transporte de metales, sin embargo, se encuentra relacionado a la tolerancia de estos, hecho que ha sido confirmado para otros genes miembros de la familia CDF que han sido descritos en otros organismos (Nies y Silver 1995; MacDiarmid, Milanick y Eide 2003).

Análisis previos realizados por nuestro equipo de trabajo en el 2017, revelaron las proteínas caracterizadas posibles homologas ortólogas a *dmct*, para este trabajo se tomaron esos datos y se analizaron a profundidad mediante alineamientos múltiples y comparaciones a nivel secuencia aminoacídica, obteniendo los resultados de la tabla 25. Al hacer la comparativa de la secuencia de la proteína *dmct* contra las posibles homólogas se observa un porcentaje de similitud que va del 19 al 44%, contrario a lo que se esperaba, se delimito el alineamiento al dominio funcional conservado CDF obteniendo una similitud del 19 a 56%, cifra que sigue resultando baja. Haney y colaboradores (2005) reportaron que el grado de conservación de la secuencia de las proteínas miembro de la familia CDF es sumamente bajo, variando incluso desde 300 a 800 aminoácidos totales. El alineamiento aminoacídico múltiple (Figura 14) también nos permitió observar la división en subgrupos de proteínas con mayor similitud entre sí. Paulser y Saier en 1996 compararon múltiples secuencias de proteínas CDF de origen celular variado, reportando tres grupos principales que a su vez se dividen en subgrupos dependiendo del tipo de célula (bacterias, levaduras, plantas, mamíferos) y de la especificidad de sustrato. Adicionalmente se encontró que la proteína *Dmct* no cuenta con las regiones ricas en histidina reportadas por Gaither y Eide (2001), pero se encontró dicha zona en algunas de las proteínas posibles homologas. Los residuos de histidina tienen afinidad por moléculas de zinc, cadmio y cobalto, Haney y colaboradores (2005) explican la ausencia de estos residuos aminoacídicos con la baja especificidad de transporte, siendo sustituidos por aspartatos y glutamatos cuya afinidad es por otros metales divalentes, aumentando con esto la promiscuidad en el transporte (Delhaize *et al.* 2003; Maser *et al.* 2002).

A pesar de las diferencias en la secuencia de los aminoácidos, como podemos observar en la figura 16, la estructura terciaria de la proteína *Dmct* es muy similar a las proteínas asociadas como posibles homologas, en este caso comparándola con *Cot1* de *S. cerevisiae* la cual está involucrada en el transporte vacuolar de zinc.

En cuanto a la regulación de la expresión del gen *dmct*, se encontraron 146 sitios de unión de 42 factores de transcripción distintos en donde los más abundantes son aquellos relacionados con respuesta a estrés, lo cual suena lógico una vez que se ubica la presencia en exceso de un metal o la carencia de este como una situación que compromete las

funciones básicas celulares. Se resalta también, la presencia de los factores de transcripción Stb4p que está involucrado en la transcripción de transportadores transmembranales en general, Aft2p el cual se transcribe en ausencia de hierro y se encarga de transcribir genes que movilizan cobre (Blauseau, Lesuisse y Camadro 2001), Yap1p que se relaciona a la tolerancia a cadmio y transcribe generalmente genes de respuesta a desintoxicación iónica y se encuentra involucrado en la expresión de proteínas tierredoxina y tierredoxina reductasa (Vido *et al.* 2000) así como Cup2p que similar a Yap1p activa la transcripción de proteínas metalotioneinas. La transcripción de este tipo de proteínas sucede cuando la célula se encuentra en un ambiente con exceso de metales, tienen la función de atrapar a los iones y mantenerlos ocupados evitando así reacciones la catálisis de reacciones de oxido reducción (Cherian, Jayasurya y Bay 2003). Finalmente se encontró la presencia de los factores Haa1p, Nrg1 y Rim101 los cuales se encuentran relacionados a respuesta a estrés por cambio de pH. El pH es de gran importancia en la química de un metal debido a que modificaciones en este, promueve que metales como hierro, cobre, cadmio entre otros, cambien su estado de oxidación, lo que resulta en la generación de radicales libres y daño oxidativo para la célula (Cuizano *et al.* 2010). De manera general, se observó que la transcripción del gen *dmct* se da solo en condiciones en donde la presencia de iones metálicos resulta amenazante para la viabilidad celular, y su función es tratar de atenuar el daño mediante la movilización de los elementos de origen. Sin embargo, este no es el único gen encargado de esa tarea, en la tabla 26 se proponen 26 genes distribuidos en los seis cromosomas que comprende el genoma de *Y. lipolytica* que posiblemente se encuentran involucrados en la toma, movilización y metabolismo de iones metálicos, tanto en vías canónicas como alternas y en condiciones de estrés.

Basado en la fenotipificación experimental de las cepas P01A (parental), Δ Dmct (mutante) y RDmct (complementaria) en medio sólido adicionado con diversos cationes (Figura 24) se observa la tolerancia generalizada a cobre, zinc y hierro de 3 mM, 20 mM y 7.5 mM respectivamente, Li y col. 2013 reportaron que en *Z. rouxi* la tolerancia por bioacumulación de cobre, zinc y hierro llega a ser de hasta 1 mM, 4 mM y 4 mM respectivamente mientras que para *S. cerevisiae* es de 1 mM, 1 mM y 4 mM, esto sumado a la alta tolerancia a sales, demuestra que *Y. lipolytica* cuenta con una mayor tolerancia a estrés iónico respecto a otras levaduras filogenéticamente relacionadas.

En el caso del calcio, *Y. lipolytica* mostró una alta tolerancia a ésta sal catiónica llegando a crecer en concentraciones de hasta 880 mM de cloruro de calcio, Beler y col. 1997 reportaron que *S. cerevisiae* puede crecer y desarrollarse normalmente con hasta 100 mM de CaCl_2 , esto resalta de igual manera la capacidad de tolerar estrés osmótico por parte de la levadura, sin embargo tanto en medio sólido y líquido adicionado con este ion se puede ver (Figura 29) un cambio morfológico de alta producción y longitud de micelio, respecto a esto, Ruiz-Herrera y Santandreu. 2002 reportaron los diferentes efectores de dimorfismo en *Y. lipolytica*, destacando un fenotipo similar al visto con el calcio la morfogénesis provocada por cambios en pH. Altas concentraciones de calcio en el medio, afecta el pH intracelular lo cual puede indicar que los cambios en los patrones clásicos de miceliación en *Y. lipolytica* se deben a los cambios de pH intracelular dados por el metabolismo del calcio y no por la ausencia del gen Dmct.

Por otro lado, el comportamiento de *Y. Lipolytica* en presencia de cobre muestra una característica inducción-represión de los mecanismos dimórficos induciendo la miceliación a 2mM y reprimida a partir de 4 mM, Siloniz y col. 2002 menciona que altas concentraciones de cobre actúan como un inductor del dimorfismo en diversas levaduras, en *Pichia gillermondi* se observa miceliación desde 63.5 mg/L sin embargo con el aumento de la concentración se observa un efecto adaptativo debido a la inducción de mecanismos de acumulación, teniendo que 317 mg/l las células pueden encontrarse en su forma de levadura por lo cual *Y. lipolytica* muestra cambios dimórficos a 2 mM de CuSO_4 siendo ésta su concentración límite antes de que comience el proceso de bioacumulación de este ion y se supriman los mecanismos de morfogénesis

Particularmente en medio líquido suplementado con hierro (Figura 35) se observó un comportamiento distinto tanto de la cepa P01A como de la mutante, ya que en cultivo las células mostraban la tendencia de precipitar el metal en forma de sal y formando cúmulos de este compuesto y células, Safarik y col. 2014 reportan este comportamiento como modificaciones magnéticas celulares, entre las levaduras que destacan por dicha característica están *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Klyuveromyces* y *Rhodotorula*. Este mecanismo es utilizado ampliamente para la extracción de iones metálicos en diversos procesos biotecnológicos.

Por otro lado, se puede decir también que esta proteína es capaz de transportar e internalizar el zinc ya que como se observa en la figura 32, la mutación de esta protege a la célula de la toxicidad producida por el exceso de este metal, Ramsay y Gadd. 1997. reportaron que en cuatro cepas distintas de *S. cerevisiae* la delección de cuatro genes involucrados en el transporte vacuolar para la detoxificación celular resulta en un aumento marcado en la sensibilidad o tolerancia a la presencia de los iones que transporta por ejemplo Cu y Cd se metaboliza en citosol y Co, Mn, Ni y Zn en vacuolas.

Los resultados globales que se presentan prueban que el transporte regulado por esta proteína es específico de metales catiónicos divalentes y no se generaliza con cationes no metálicos como el calcio.

IX. CONCLUSIONES

- ✓ El gen *dmct* (*Yali_F19734g*) codifica a una proteína transmembranal involucrada en el transporte exclusivo de metales de transición en forma de catión divalente sin embargo no muestra especificidad de sustrato.
- ✓ Los resultados parciales sugieren que la proteína Dmct se localiza en membranas de organelos intracelulares y se ve implicado al almacenamiento y tolerancia de iones.
- ✓ Resulta difícil atribuir los cambios morfológicos observados a la ausencia del transportador Dmct ya que pueden ser provocados en respuesta a las condiciones extremas sometidas en los tratamientos iónicos.
- ✓ Los resultados sugieren que la proteína Dmct está involucrado en el equilibrio homeostático del cobre, zinc y hierro, la ausencia de este genera células capaces de tolerar concentraciones de zinc y cobre más altas respecto a la parental debido a que estimula la expresión de genes de respuesta a estrés por exceso de iones
- ✓ *Dmct* no resulta un gen vital para el transporte y la homeostasis de los iones zinc, cobre y calcio.

X. PERSPECTIVAS

- ✓ Analizar los genes de función sinónima que se expresan a consecuencia de la ausencia del gen *dmct*
- ✓ Estudiar el evento de magnetismo celular observado con el hierro
- ✓ Evaluar las aplicaciones biotecnológicas aplicables como biorremediación, biolixiviación, detoxificación, separación de metales, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, N. C. 2002. Metal transporters and disease. *Current opinion in chemical biology*, 6(2), 181-186.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:215-237.
- Anton, A., Weltrowski, A., Haney, C. J., Franke, S., Grass, G., Rensing, C., and Nies, D. H. 2004. Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 186(22), 7499-7507.
- Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith and Struhl. 1994. *Current protocols in molecular biology*, Current Protocols, Brooklyn, N.Y.
- Bellou, S., Makri, A., Triantaphyllidou, I. E., Papanikolaou, S., and Aggelis, G. 2014. Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiology*, 160(4), 807-817.
- Birmingham-McDonogh, O., Gralla, E. B., and Valentine, J. S. 1988. The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(13), 4789-4793.
- Bird, A. J., McCall, K., Kramer, M., Blankman, E., Winge, D. R., and Eide, D. J. 2003. Zinc fingers can act as Zn²⁺ sensors to regulate transcriptional activation domain function. *The EMBO Journal*, 22(19), 5137-5146.
- Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D., and Chalot, M. 2003. Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *The Plant Cell*, 15(12), 2911-2928.
- Bleackley, M. R., and MacGillivray, R. T. 2011. Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals*, 24(5), 785-809.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G. R. 1987. [10] 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. In *Methods in enzymology* (Vol. 154, pp. 164-175). Academic Press.
- Bull, P. C., and Cox, D. W. 1994. Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends in Genetics*, 10(7), 246-252.
- Casaregola, S., Neuvéglise, C., Lépingle, A., Bon, E., Feynerol, C., Artiguenave, F., ... and Gaillardin, C. 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS letters*, 487(1), 95-100.
- Chao, Y., and Fu, D. 2004. Kinetic Study of the Antiport Mechanism of an *Escherichia coli* Zinc Transporter, ZitB. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12043–12050. doi:10.1074/jbc.m313510200
- Chen, M., Shen, X., Li, D., Ma, L., Dong, J., and Wang, T. 2009. Identification and characterization of MtMTP1, a Zn transporter of CDF family, in the *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(11-12), 1089-1094.
- Clemens, S., Bloß, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D. H., and zur Nieden, U. 2002. A transporter in the endoplasmic reticulum of *S. pombe* cells mediates Zn storage and differentially affects transition metal tolerance. *Journal of Biological Chemistry*.
- Cragg, R. A., Christie, G. R., Phillips, S. R., Russi, R. M., Küry, S., Mathers, J. C., ... and Ford, D. 2002. A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocyte apical membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22789-22797.

- Culotta, V. 2010. Cell biology of copper.
- Da Silva, F., and Williams, R. 1999. Copper: extracytoplasmic oxidases and matrix formation. *The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life.* Clarendon Press, Oxford, 418-435.
- Dancis, A., Haile, D., Yuan, D. S., and Klausner, R. D. 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25660-25667.
- Davidow, L. S., Apostolakos, D., O'Donnell, M. M., Proctor, A. R., Ogrydziak, D. M., Wing, R. A., ... and DeZeeuw, J. R. 1985. Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current genetics*, 10(1), 39-48.
- Delhaize, E., Kataoka, T., Hebb, D. M., White, R. G., and Ryan, P. R. 2003. Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *The Plant Cell*, 15(5), 1131-1142.
- Deng, H. X., Hentati, A., Tainer, J. A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W. Y., ... and Roos, R. P. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science*, 261(5124), 1047-1051.
- Desbrosses-Fonrouge, A. G., Voigt, K., Schröder, A., Arrivault, S., Thomine, S., and Krämer, U. 2005. *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS letters*, 579(19), 4165-4174.
- Dinh, T., Paulsen, I. T., and Saier, M. H. 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, 176(13), 3825-3831.
- Dix, DR, JT Bridgham, MA Broderius, CA Byersdorfer y DJ Eide. 1994. El gen FET4 codifica la proteína de transporte Fe (II) de baja afinidad de *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* 269 : 26092 -26099.
- Eide, D. J. 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 711-722.
- Eide, D. J. 2009. Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(28), 18565-18569.
- Ellis, C. D., MacDiarmid, C. W., and Eide, D. J. 2005. Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(31), 28811-28818.
- Fagan, M. J., and Saier, M. H. 1994. P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *Journal of molecular evolution*, 38(1), 57-99.
- Fitsanakis, V. A., Zhang, N., Garcia, S., and Aschner, M. 2010. Manganese (Mn) and iron (Fe): interdependency of transport and regulation. *Neurotoxicity research*, 18(2), 124-131.
- Fu, D., Beeler, T. J., and Dunn, T. M. 1995. Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca²⁺-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu²⁺-ATPase subfamily. *Yeast*, 11(3), 283-292.
- Georgatsou, E., and Alexandraki, D. 1994. Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 14(5), 3065-3073.
- González-Guerrero, M., Azcón-Aguilar, C., Mooney, M., Valderas, A., MacDiarmid, C. W., Eide, D. J., and Ferrol, N. 2005. Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genetics and Biology*, 42(2), 130-140.

- Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Franke, S., Nies, D. H., and Rensing, C. 2001. ZitB (YbgR), a Member of the Cation Diffusion Facilitator Family, Is an Additional Zinc Transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 183(15), 4664-4667.
- Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C. J., Rensing, C., Nies, D. H., and Munkelt, D. 2004. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Archives of Microbiology*, 183(1), 9–18. doi:10.1007/s00203-004-0739-4
- Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C. J., Rensing, C., Nies, D. H., and Munkelt, D. 2005. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Archives of microbiology*, 183(1), 9-18.
- Guffanti, A. A., Wei, Y., Rood, S. V., and Krulwich, T. A. 2002. An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K⁺ and H⁺. *Molecular Microbiology*, 45(1), 145–153. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02998.
- Haas, H., I. Zadra, G. Stöffler, and K. Angermayr. 1999. The *Aspergillus nidulans* GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. *J. Biol. Chem.* 274:4613-4619
- Haas, H., K. Angermayr, and G. Stöffler. 1997. Molecular analysis of a *Penicillium chrysogenum* GATA factor encoding gene (sreP) exhibiting significant homology to the *Ustilago maydis* *urbs1* gene. *Gene* 184:33-37.
- Hall, J. L., and Williams, L. E. 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of experimental botany*, 54(393), 2601-2613.
- Haney, C. J., Grass, G., Franke, S., and Rensing, C. 2005. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(6), 215-226.
- Hoffman, C. S., and Winston, F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformiaon of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267-272.
- Holliday, R. 1961. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genetics Research*, 2(2), 231-248.
- Hornig, Y. C., Cobine, P. A., Maxfield, A. B., Carr, H. S., and Winge, D. R. 2004. Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35334-35340.
- Huang, L., and Gitschier, J. 1997. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nature genetics*, 17(3), 292.
- Ito, H., Inouhe, M., Tohoyama, H., and Joho, M. 2007. Characteristics of copper tolerance in *Yarrowia lipolytica*. *Biometals*, 20(5), 773-780.
- Jensen, L. T., Ajua-Alemanji, M., and Culotta, V. C. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42036-42040.
- Kambe, T., Narita, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Hirose, J., Amano, T., Sugiura, N., ... and Nagao, M. 2002. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic β cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 19049-19055.
- Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R., and Nagao, M. 2004. Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 61(1), 49-68.
- Kawasse, F. M., Amaral, P. F., Rocha-Leão, M. H. M., Amaral, A. L., Ferreira, E. C., and Coelho, M. A. Z. 2003. Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioprocess and biosystems engineering*, 25(6), 371-375.

- Knight, S. A., Labbe, S., Kwon, L. F., Kosman, D. J., and Thiele, D. J. 1996. A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes and development*, 10(15), 1917-1929.
- Kuan, G., Dassa, E., Saurin, W., Hofnung, M., and Saier Jr, M. H. 1995. Phylogenetic analyses of the ATP-binding constituents of bacterial extracytoplasmic receptor-dependent ABC-type nutrient uptake permeases. *Research in microbiology*, 146(4), 271-278.
- Kumar, N. 2006. Copper deficiency myelopathy (human swayback). In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 81, No. 10, pp. 1371-1384). Elsevier.
- Labbé, S., Zhu, Z., and Thiele, D. J. 1997. Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 272(25), 15951-15958.
- Lee, S. M., Grass, G., Haney, C. J., Fan, B., Rosen, B. P., Anton, A., ... and Rensing, C. 2002. Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. *FEMS microbiology letters*, 215(2), 273-278.
- Lee, T. I., N. J. Rinaldi, F. Robert, D. T. Odom, Z. Bar-Joseph, G. K. Gerber, N. M. Hannett, C. T. Harbison, C. M. Thompson, I. Simon, J. Zeitlinger, E. G. Jennings, H. L. Murray, D. B. Gordon, B. Ren, J. J. Wyrick, J. B. Tagne, T. L. Volkert, E. Fraenkel, D. K. Gifford, and R. A. Young. 2002. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298:799-804.
- Li, L., and Kaplan, J. 1997. Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28485-28493.
- Lin, S. J., Pufahl, R. A., Dancis, A., O'Halloran, T. V., and Culotta, V. C. 1997. A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *Journal of Biological Chemistry*, 272(14), 9215-9220.
- Lin, S. J., R. A. Pufahl, A. Dancis, T. V. O'Halloran, and V. C. Culotta. 1997. A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J. Biol. Chem.* 272:9215-9220.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., and Pedersen, J. 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of clinical microbiology*, 38(1), 471-471.
- MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A., and Eide, D. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 19(12), 2845-2855.
- MacDiarmid, C. W., Milanick, M. A., and Eide, D. J. 2002. Biochemical Properties of Vacuolar Zinc Transport Systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39187-39194. doi:10.1074/jbc.m205052200
- MacPherson, I. S., and Murphy, M. E. P. 2007. Type-2 copper-containing enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(22), 2887-2899.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., ... and Harper, J. F. 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126(4), 1646-1667.
- McCall, K. A., Huang, C. C., and Fierke, C. A. 2000. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1437S-1446S.
- Miura, Y., Wake, H., and Kato, T. 1999. TBE, or not TBE; that is the question: Beneficial usage of tris-borate for obtaining a higher resolution of small DNA fragments by agarose gel electrophoresis. *Nagoya medical journal*, 43(1), 1-6.

- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., and Chalot, M. 2007. Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC genomics*, 8(1), 107.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., and Chalot, M. 2007. Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC genomics*, 8(1), 107.
- Munkelt, D., Grass, G., and Nies, D. H. 2004. The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *Journal of bacteriology*, 186(23), 8036-8043.
- Murgia, C., Vespignani, I., Cerase, J., Nobili, F., and Perozzi, G. 1999. Cloning, expression, and vesicular localization of zinc transporter Dri 27/ZnT4 in intestinal tissue and cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277(6), G1231-G1239.
- Nies, D. H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 313-339.
- Nies, D. H., and Silver, S. 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of industrial microbiology*, 14(2), 186-199.
- Ooi, C. E., Rabinovich, E., Dancis, A., Bonifacino, J. S., and Klausner, R. D. 1996. Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *The EMBO Journal*, 15(14), 3515-3523.
- Orozco, M., Jiménez, A., Acuña, O., and Álvarez, V. 2015. Determinación del crecimiento de hongos nematófagos en diversas fuentes de carbono. *Agronomía Costarricense*. Outten, C. E., and O'Halloran, T. V. (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, 292(5526), 2488-2492.
- Palmiter, R. D., Cole, T. B., and Findley, S. D. 1996. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *The EMBO journal*, 15(8), 1784-1791.
- Palmiter, R. D., Cole, T. B., Quaife, C. J., and Findley, S. D. 1996. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14934-14939.
- Pan, K. M., Stahl, N., and Prusiner, S. B. 1992. Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Science*, 1(10), 1343-1352.
- Paulsen, I. T., and Saier Jr, M. H. 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *The Journal of membrane biology*, 156(2), 99-103.
- Paulsen, I. T., and Saier Jr, M. H. 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *The Journal of membrane biology*, 156(2), 99-103.
- Pelletier, B., J. Beaudoin, Y. Mukai, and S. Labbé. 2002. Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 277:22950-22958.
- Pénicaud, C., Landaud, S., Jamme, F., Talbot, P., Bouix, M., Ghorbal, S., and Fonseca, F. 2014. Physiological and biochemical responses of *Yarrowia lipolytica* to dehydration induced by air-drying and freezing. *PLoS one*, 9(10), e111138.
- Philpott, C. C., and Protchenko, O. 2008. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 7(1), 20-27.
- Pietrangolo, A. 2002. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 282(3), G403-G414.

- Portnoy, M. E., L. T. Jensen, and V. C. Culotta. 2002. The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast. *Biochem. J.* 362:119-124.
- Portnoy, M. E., X. F. Liu, and V. C. Culotta. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol. Cell. Biol.* 20:7893-7902.
- Rana, A., Gnaneswari, D., Bansal, S., and Kundu, B. 2009. Prion metal interaction: Is prion pathogenesis a cause or a consequence of metal imbalance?. *Chemico-biological interactions*, 181(3), 282-291.
- Rees, E. M., Lee, J., and Thiele, D. J. 2004. Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54221-54229.
- Robinson, N. J., and Winge, D. R. 2010. Copper metallochaperones. *Annual review of biochemistry*, 79.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., ... and Rahmani, Z. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59.
- Ruiz-Herrera, J., León, C. G., Guevara-Olvera, L., and Cárabez-Trejo, A. 1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 141(3), 695-703.
- Rutherford, J. C., and Bird, A. J. 2004. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryotic cell*, 3(1), 1-13.
- Rutherford, J. C., S. Jaron, and D. R. Winge. 2003. Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J. Biol. Chem.* 278:27636-27643.
- Safarik, I., Maderova, Z., Pospiskova, K., Baldikova, E., Horska, K., and Safarikova, M. 2015. Magnetically responsive yeast cells: methods of preparation and applications. *Yeast*, 32(1), 227-237.
- Saier, M. H. 1994. Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 58(1), 71-93.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, the third edition. Immunol, 49, 895-909.
- Schilke, B., C. Voisine, H. Beinert, and E. Craig. 1999. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10206-10211.
- Seetharaman, S. V., Prudencio, M., Karch, C., Holloway, S. P., Borchelt, D. R., and Hart, P. J. 2009. Immature copper-zinc superoxide dismutase and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Biology and Medicine*, 234(10), 1140-1154.
- Shi, W., Zhan, C., Ignatov, A., Manjasetty, B. A., Marinkovic, N., Sullivan, M., ... and Chance, M. R. 2005. Metalloproteomics: high-throughput structural and functional annotation of proteins in structural genomics. *Structure*, 13(10), 1473-1486.
- Silóniz, M. I., Balsalobre, L., Alba, C., Valderrama, M. J., and Peinado, J. M. 2002. Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. *Research in microbiology*, 153(3), 173-180.
- Simm, C., Lahner, B., Salt, D., LeFurgey, A., Ingram, P., Yandell, B., and Eide, D. J. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. *Eukaryotic cell*, 6(7), 1166-1177.
- Stearman, R., D. S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R. D. Klausner, and A. Dancis. 1996. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271:1552-1557.

- Szabo, R. 2001. Cla4 protein kinase is essential for filament formation and invasive growth of *Yarrowia lipolytica*. *Molecular genetics and genomics*, 265(1), 172-179.
- Tam, R. O. L. A. N. D., and Saier, M. H. 1993. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 57(2), 320-346.
- Thorvaldsen, J. L., A. K. Sewell, A. M. Tanner, J. M. Peltier, I. J. Pickering, G. N. George, and D. R. Winge. 1994. Mixed Cu⁺ and Zn²⁺ coordination in the DNA-binding domain of the AMT1 transcription factor from *Candida glabrata*. *Biochemistry* 33:9566-9577.
- Ueta, R., A. Fukunaka, and Y. Yamaguchi-Iwai. 2003. Pse1p mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278:50120-50127.
- Urbanowski, J. L., and R. C. Piper. 1999. The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J. Biol. Chem.* 274:38061-38070.
- Uriu-Adams, J. Y., Scherr, R. E., Lanoue, L., and Keen, C. L. 2010. Influence of copper on early development: prenatal and postnatal considerations. *Biofactors*, 36(2), 136-152.
- Valko, M. M. H. C. M., Morris, H., and Cronin, M. T. D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161-1208.
- Voisard, C., J. Wang, J. L. McEvoy, P. Xu, and S. A. Leong. 1993. urbs1, a gene regulating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*, encodes a protein similar to the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol. Cell. Biol.* 13:7091-7100.
- Voutsina, A., G. S. Fragiadakis, A. Boutla, and D. Alexandraki. 2001. The second cysteine-rich domain of Mac1p is a potent transactivator that modulates DNA binding efficiency and functionality of the protein. *FEBS*
- Waldron, K. J., and Robinson, N. J. 2009. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 25.
- Waters, B. M., and Eide, D. J. 2002. Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 33749-33757.
- Wei, Y., and Fu, D. 2005. Selective metal binding to a membrane-embedded aspartate in the *Escherichia coli* metal transporter YiiP (FieF). *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33716-33724.
- Westergard, L., Christensen, H. M., and Harris, D. A. 2007. The cellular prion protein (PrPC): its physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1772(6), 629-644.
- Williams, R. J. P. 1987. The biochemistry of zinc. *Polyhedron*, 6(1), 61-69.
- Wong, B. S., Chen, S. G., Colucci, M., Xie, Z., Pan, T., Liu, T., ... and Brown, D. R. 2001. Aberrant metal binding by prion protein in human prion disease. *Journal of neurochemistry*, 78(6), 1400-1408.
- Yamaguchi-Iwai, Y., R. Stearman, A. Dancis, and R. D. Klausner. 1996. Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *EMBO J.* 15:3377-3384
- Yonkovich, J., McKendry, R., Shi, X., and Zhu, Z. 2002. Copper ion-sensing transcription factor Mac1p post-translationally controls the degradation of its target gene product Ctr1p. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 23981-23984.

Yuan, D. S., R. Stearman, A. Dancis, T. Dunn, T. Beeler, and R. D. Klausner. 1995. The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2632-2636

Yuan, D. S., Stearman, R., Dancis, A., Dunn, T., Beeler, T., and Klausner, R. D. 1995. The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 2632-2636.

Yun, C. W., J. S. Tiedeman, R. E. Moore, and C. C. Philpott. 2000. Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *J. Biol. Chem.* 275:16354-16359

Zhang, B., O. Georgiev, M. Hagmann, C. Gunes, M. Cramer, P. Faller, M. Vasák, and W. Schaffner. 2003. Activity of metal responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* 23:8471-8485

Zhang, Y., and Gladyshev, V. N. 2009. Comparative genomics of trace elements: emerging dynamic view of trace element utilization and function. *Chemical reviews*, 109(10), 4828-4861.

Zhao, H., and Eide, D. 1996. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(6), 2454-2458.

Zhao, H., and Eide, D. 1996. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23203-23210.

Zhou, L. W., H. Haas, and G. A. Marzluf. 1998. Isolation and characterization of a new gene, *sre*, which encodes a GATA-type regulatory protein that controls iron transport in *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.* 259:532-540.

Shingles, R., Wimmers, L. E., and McCarty, R. E. 2004. Copper transport across pea thylakoid membranes. *Plant physiology*, 135(1), 145-151.

Life Technologies is a Thermo Fisher Scientific brand. 2014. Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

Ruiz-Herrera, J., García-Maceira, P., Castillo-Barahona, L. C., Valentín, E., and Sentandreu, R. 2003. Cell wall composition and structure of *Yarrowia lipolytica* transposon mutants affected in calcofluor sensitivity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84(3), 229-238.

ANEXOS

Tabla 16. Localización subcelular de proteínas homologas a Dmct de *Y. lipolytica*. La lista de genes y proteínas se obtuvo a partir de la comparación de las secuencias aminoacídicas utilizando el software WoLF PSORT. Los datos que se muestran son complementarios a los presentados en la tabla 12.

Gen	Proteína	Organismo	%ID	Localización
<i>Dnf2</i>	ATPasa transportadora de fosfolípidos DNF2	<i>S. cerevisiae</i>	11	Membrana plasmática
<i>Pma1</i>	ATPasa 1 de membrana plasmática	<i>C. albicans</i>	14	Membrana plasmática
<i>Fet4</i>	Proteína de transporte de baja afinidad Fe (2+)	<i>S. cerevisiae</i>	12	Membrana plasmática
<i>Dnf1</i>	ATPasa transportadora de fosfolípidos DNF1	<i>S. cerevisiae</i>	11	Membrana plasmática
<i>Pma2</i>	ATPasa 2 de membrana plasmática	<i>S. cerevisiae</i>	13	Membrana plasmática
<i>Pm1</i>	ATPasa transportadora de calcio 2	<i>S. cerevisiae</i>	12	Vacuola
<i>Pma1</i>	ATPasa de membrana plasmática	<i>K. lactis</i>	14	Membrana plasmática
<i>Pmr1</i>	Calcium-transporting ATPase 1	<i>Y. lipolytica</i>	14	Aparato de golgi
<i>Chs3</i>	Quitina sintasa 3	<i>C. albicans</i>	11	Membrana plasmática
<i>Pma1</i>	ATPasa 1 de membrana plasmática	<i>S. pombe</i>	13	Membrana plasmática
<i>Sul2</i>	Sulfato permeasa 2	<i>S. cerevisiae</i>	12	Membrana plasmática
<i>Ena5</i>	Transporte de sodio ATPasa 5	<i>S. cerevisiae</i>	14	Membrana plasmática
<i>N/A</i>	ATPasa de membrana plasmática	<i>Z. rouxii</i>	14	Membrana plasmática
<i>Ena2</i>	Transporte de sodio ATPasa 2	<i>S. cerevisiae</i>	14	Membrana plasmática
<i>Chs2</i>	Quitina sintasa 2	<i>P. brasiliensis</i>	13	Membrana plasmática
<i>Chs3</i>	Quitina sintasa 3	<i>N. crassa</i>	14	Membrana plasmática
<i>pma2</i>	ATPasa 2 de membrana plasmática	<i>S. pombe</i>	14	Membrana plasmática
<i>Mam1</i>	Factor de apareamiento M proteína de secreción mam1	<i>S. pombe</i>	11	Membrana plasmática
<i>Chs2</i>	Quitina sintasa 2	<i>R. oligosporus</i>	14	Membrana plasmática
<i>Chs6</i>	Quitina sintasa 6	<i>U. maydis</i>	13	Membrana plasmática
<i>Rgt2</i>	Sensor de glucosa alta RGT2	<i>S. cerevisiae</i>	14	Membrana plasmática
<i>Chs4</i>	Quitina sintasa 4	<i>M. oryzae</i>	12	Membrana plasmática
<i>Ena1</i>	Transporte de sodio ATPasa 1	<i>S. cerevisiae</i>	13	Membrana plasmática
<i>Pmt1</i>	Dolililfosfato-manosa - proteína manosiltransferasa 1	<i>S. cerevisiae</i>	13	Retículo endoplasmático
<i>Chsd</i>	Quitina sintasa D	<i>E. nidulans</i>	11	Membrana plasmática
<i>Pma-1</i>	ATPasa de membrana plasmática	<i>N. crassa</i>	13	Membrana plasmática

Tabla 17. Lista de posibles factores de transcripción con sitios de unión en la región promotora de *dmct*. Identificados mediante el software Yeastract basados en la homología con *S. cerevisiae*

Factor de transcripción	
Abf1p	Tye7p
Ash1p	Mig1p
Cbf1p	Mig2p
Crz1p	Mot3p
Cup2p	Nrg1p
Adr1p	Oaf1p
Aft2p	Pho4p
Aft1p	Pip2p
Bas1p	Rgt1p
Gcn4p	Rox1p
Fkh1p	Rtg1p
Fkh2p	Rtg3p
Gcr1p	Skn7p
Gis1p	Stb5p
Msn2p	Ste12p
Msn4p	Tec1p
Rph1p	Yap1p
Com2p	Pho2p
Usv1p	Mot2p
Ma163p	Haa1p
Met4p	Tda9p

Tabla 18. Lista de softwares utilizados

Nombre del programa	Liga	Uso
Wolf PSORT	https://www.genscript.com/wolf-psort.html	Predicción de la localización subcelular de la proteína Dmct
TMHMM-2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? TMHMM-2.0	Predicción de la topología transmembranal de la proteína Dmct
PhylomeDB	http://phylomedb.org/	Análisis filogenético y predicción de proteínas ortólogas
UniProt	https://www.uniprot.org/	Obtener información de proteínas
BioEdit V7.0	https://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/Trace_viewer_reviews/BioEdit/	Alineamientos de secuencias múltiples
CDD-NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	Delimitación de dominos funcionales
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov	Obtención de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas
Yeasttract	http://www.yeasttract.com/findregulators.php	Análisis de la región reguladora del gen <i>dmct</i>
NEB Cutter	http://nc2.neb.com/NEBcutter2/	Determinación de sitios de corte de las enzimas de restricción EcoRI, XhoI y SacI

Secuencia nucleotídica correspondiente a la región promotora del gen *dmct* de *Y. lipolytica*.

>CR382132.1:2623359-2624358 *Yarrowia lipolytica* CLIB122 chromosome F complete sequence

ATGGAGACAAGAGTTAGCGTTTGGCAAGTGCAATAGAGTTGGGTGTGAAATATGACTGGAGTCTTTTTTTTTTTTTTTGG
 TTTCAGCATAATATATATCAAGTGTGTATACTTTAATACTGACAAGTAATGAAACACGTTTCGACCTCCCCAAACCAC
 CTATAGACATGTATGGATATCTATATGTATATATACCATCTCCCCTCTATCCCCTACCCTAACCCGTCAGGGGATTTA
 AGGGTTGAGTGCAGGAGTGCAGGTTAGGGGATGACCCCTCCAGGCAGGGGACAGATGGCAAAGTCAGGTTTTTCCGT
 GATTACGCGGGGTGGCGCACAAAGGCGCAGATGTTGATGGGAGGGGACAGAAGATGGTATAGTGGAGATGTTGAGAG
 GTGGGGAGGGGTTACTGGGTATGAGGGAAAGTAGGGTTAGGGGCAATTATCCCCTTTTCACGCTACTGTGCCGAAT
 TCGGCCTTAGAAGCTCTAGTTCTCTATTCTTCATTTAGGTCTAAGCCCTGTCCAATAGTTTGACGTGTATGATAATC
 TGCGGGTCTAGAATTATGTTAAGCTTCTCCAGAGGTGATTTATCTCCGTCTTTTGAGACCACGGTGTCTGAGTGAGC
 GTGTACCAGTAGGGTAACTCTTTTGAGGGGCTTTCGAATTATGTTGAGAGTCACAGATAAACGTCTTGTCGCGCCCC
 ACTCTTTTGTATGTTCCAAACAAATTGTTTATGGTATTCGGCGTTGGTATCATGCACGTTAACCTAGTTTATCTGATG
 TAATGAGAGATATATAGCTTGCAGGAATAGTGTCCGATTGAGTTGGGAGTAGATTGAGTGGAAAGCTCTCCTTTTTAG
 CTTTCGATTGATATGCTTACGTGACCATATCTCCCCGCACCATGCGCCAAATCACCCCTAGCTGCACCTAACCCTAG
 CCATGCAGATGTAACAGTGAAAAATCCGAAGGCCACCATTCTGCCTTGTAACACCC

Secuencia parcial obtenida del cromosoma F de *Yarrowia lipolytica* CLIB122 del GeneBank-NCBI

Liga: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_006072.1

RESUMEN BIOGRÁFICO

Katia Jamileth González Lozano

Candidata para el grado de
Maestra en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis de Licenciatura en Biotecnología Genómica: Caracterización de la función de un posible transportador de cationes en *Yarrowia lipolytica*

Tesis de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología: Caracterización de la función de la proteína de eflujo de cationes Dmct (Yali0F19734p) en *Yarrowia lipolytica*.

Campo de estudio: Fisiología de microorganismos, genómica comparativa, funcional y estructural.

Datos personales

Lugar de nacimiento: Guadalupe, Nuevo León, México; el 10 de febrero de 1995.

Padres: Cayetano González Arizpe e Hilda Marcela Lozano Salinas.

Formación académica: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el 2017 con el grado de Licenciada en Biotecnología Genómica.

Experiencia profesional:

Miembro de la Unidad de Manipulación Genética del Laboratorio de Micología y Fitopatología desde el 2015.

Miembro del cuerpo académico de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, desde el 2017.

Miembro de la academia “Genoma y sus Funciones” de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL desde 2017.

Profesora de las materias de Genómica Comparativa, Genómica Funcional y Genómica Estructural para alumnos de la Licenciatura en Biotecnología Genómica.

Estancias de investigación:

Laboratorio de Proteomica del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública de la Facultad de Salud Publica y Nutricion de la UANL, en 2017 y 2019.

Laboratorio de Desarrollo y Diferenciación de Hongos del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, en 2020.